

Die räumliche Energieverbrauchskonfiguration (SEEC) und mögliche Anwendungen im Tiermodell der Arthritis



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der
Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg

vorgelegt von

Susanne Klatt
aus Brandenburg an der Havel

im Jahr
2015

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 28.04.2015

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. med. Rainer H. Straub

Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis IV

1 Einleitung.....1

1.1 Rheumatoide Arthritis 1

1.1.1 Tiermodell der Kollagen Typ II-induzierten Arthritis 4

1.2 Neuroendokrine Veränderungen bei rheumatoider Arthritis 5

1.2.1 Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse (HPA-Achse) 5

1.2.2 Das sympathische Nervensystem (SNS) 7

1.3 Energieregulation bei chronisch entzündlichen Erkrankungen..... 9

1.3.1 Systemische Energieregulation 11

1.3.2 Zelluläre Bioenergetik..... 13

1.3.3 Sauerstoffverbrauchsmessungen als Maß des Energieverbrauchs..... 16

1.3.4 Temperaturperzeption und Energieumverteilung 17

1.4 Mechanismen des Homing von Immunzellen..... 17

1.4.1 Zelladhäsionsmoleküle und ihre Rezeptoren im Kontext der Migration aus dem Gefäßsystem 18

1.4.2 Egress von Lymphozyten aus lymphatischen Organen 20

1.5 Zielsetzungen und Fragestellungen..... 20

2 Material und Methoden23

2.1 Materialien 23

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien..... 23

2.1.2 Antikörper für FACS..... 24

2.1.3 Medien, Lösungen und Puffer..... 24

2.1.4 Kits und Assays..... 26

2.1.5 Verbrauchsmaterialien 26

2.1.6 Geräte 27

2.1.7 Tiere 28

2.2 Methoden..... 28

2.2.1 Kollagen induzierte Arthritis..... 28

2.2.1.1 Arthritisinduktion bei DBA1/J Mäusen..... 28

2.2.1.2 Arthritisinduktion bei C57BL/6 Mäusen..... 29

2.2.1.3 Klinischer Arthritis-Schweregrad..... 29

2.2.2 Depletion sympathischer Neuronen mittels 6-Hydroxydopamin (Sympathektomie).....	30
2.2.3 Zucht und Genotypisierung von <i>Atgl</i> - Knockout Mäusen.....	30
2.2.3.1 Präparation von genomischer DNA aus Mausgewebe.....	31
2.2.3.2 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.2.3.3 Agarosegelelektrophorese.....	33
2.2.4 Auslösen von Kältezittern mittels Icilin	34
2.2.4.1 Implantation programmierbarer Temperaturtransponder.....	35
2.2.5 Organentnahme.....	35
2.2.6 Isolation muriner Primärzellen aus Milz und Lymphknoten.....	35
2.2.7 Zellzählung	36
2.2.8 <i>In vitro</i> Sauerstoffmessungen in Zell- und Gewebekultur.....	36
2.2.8.1 Sauerstoffmessungen in Zellkultur	39
2.2.8.2 Sauerstoffmessungen in Gewebekultur.....	40
2.2.8.3 Standardisierung der “ <i>Spatial Energy Expenditure Configuration</i> (SEEC)“-Methode.....	40
2.2.9 PKH26-Markierung isolierter Lymphknoten- und Milzzellen.....	42
2.2.10 Intravenöse Zellinjektion	42
2.2.11 Durchflusszytometrische Messungen.....	43
2.2.11.1 Oberflächenfärbungen.....	44
2.2.11.2 Färbung intrazellulärer Moleküle.....	44
2.2.12 ELISA	44
2.2.12.1 Blutentnahme zur Serumgewinnung.....	45
2.2.12.2 Kompetitiver ELISA zur Bestimmung von Sphingosin-1-Phosphat	45
2.2.12.3 Sandwich ELISA zur Bestimmung von anti-Kollagen Typ II Antikörpern	46
2.2.12.4 Elutionsmethode zur Antikörper-Aviditätsbestimmung mit NaSCN	47
2.2.12.5 Sandwich ELISA zur Bestimmung von murinem CCL21	48
2.2.13 Statistik.....	48
3 Ergebnisse	50
3.1 Sauerstoffverbrauchsmessungen.....	50
3.1.1 Arthritis und Sympathektomie: Bedeutung des sympathischen Nervensystems.....	54
3.1.2 Arthritis in <i>Atgl</i> -KO Mäusen: Bedeutung der Lipolyse.....	59
3.1.3 Arthritis und Kältezittern: Auslösen einer Energieumverteilung mittels Icilin.....	65

3.2	Modulation der Zellmigration durch frühe Sympathektomie	70
3.2.1	Zellzahlen von Milz und Lymphknoten	70
3.2.2	FACS-Analyse von Milz- und Lymphknotenzellen aus Empfängertieren nach Transfer PKH26 markierter Zellen	71
3.3	Auswirkungen auf die Expression von Zelladhäsionsmolekülen in Milz und Lymphknoten nach Sympathektomie	73
3.3.1	CCL21 Sekretion in Kultur von Milz- und Lymphknotenzellen	75
3.4	Einfluss der Sympathektomie auf den Egress von Lymphozyten	76
3.4.1	Sphingosin-1-Phosphat Level im Serum von Kontrolltieren, arthritischen und sympathektomierten Tieren	77
3.5	Einfluss der frühen Sympathektomie auf die Affinitätsreifung Kollagen Typ II spezifischer Antikörper	78
3.5.1	Thiocyanat basierte Elution von anti-Kollagen Typ II Antikörpern aus Mausserum	79
4	Diskussion	81
4.1	<i>Spatial Energy Expenditure Configuration</i> (SEEC)	81
4.2	Einfluss des sympathischen Nervensystems auf das Homing von Immunzellen	84
5	Zusammenfassung	88
6	Summary	91
7	Literatur	94
8	Publikationen	110
9	Lebenslauf	112
10	Danksagung	113
11	Eidesstattliche Erklärung	114

Abkürzungsverzeichnis

6-OHDA	6-Hydroxydopamin
aCII	Anti-Kollagen Typ II Antikörper
ACTH	<i>Adrenocorticotrophic hormone</i>
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AK	Antikörper
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AR	Adrenorezeptor
ATGL	Adipozyten Triglycerid Lipase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCR	<i>B cell receptor</i>
bp	<i>base pairs</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CAMs	<i>Cell adhesion molecules</i>
CCL21	C-C Chemokin Ligand 21
CCR7	C-C Chemokin Rezeptor 7
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD62L	L-Selektin
CFA	komplettes Freund Adjuvant
CIA	Kollagen Typ II-induzierte Arthritis
CII	Kollagen Typ II
CRH	<i>Corticotropin-releasing hormone</i>
DCs	dendritische Zellen
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FTY720	Fingolimod
HANS-Achse	Hypothalamus-Autonomes-Nervensystem-Achse

HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure
HEVs	<i>High endothelial venules</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
i.p.	intraperitoneal
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
KG	Körpergewicht
kJ	Kilojoule
Ko	Kontrolle
LFA1	<i>Leukocyte function associated antigen</i>
LN	Lymphknoten
M	molar, mol/l
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
MWU-Test	Mann-Whitney-U-Test
n.s.	Nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaSCN	Natriumthiocyanat
NN	Nebennieren
OD	Optische Dichte
p	p-Wert, Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PP	Peyer´sche Platten
PSNS	Parasympathisches Nervensystem
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktoren
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan

S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SCN	Thiocyanat-Ion
SDR	Sensor Dish ® Reader
SEEC	<i>Spatial energy expenditure configuration</i>
SLOs	Sekundäre lymphatische Organe
SNS	sympathisches Nervensystem
SYX	frühe Sympathektomie
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TRPM8	<i>Transient receptor potential melastin 8</i>
WDS	<i>Wet dog shakes</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine komplexe multifaktorielle Systemerkrankung, deren genaue Ursache unbekannt ist. Diese chronisch entzündliche Gelenkerkrankung äußert sich in Symptomen wie Schmerz, Schwellung und Steifheit insbesondere von Hand- und Fingergelenken, wobei ein symmetrisches Befallsmuster oft sichtbar ist. Auch Zehen-, Fuß-, Schulter-, und Hüftgelenke können betroffen sein. Die Inflammationsvorgänge verursachen eine Schwellung und Schmerzen (Synovitis) in den betroffenen Gelenken. Im späteren Stadium führt dies zu Gelenkdeformationen bis hin zur Gelenkzerstörung und Bewegungseinschränkungen (1). Weltweit sind ca. 0,5- 1 % der Bevölkerung betroffen. Die RA zählt zu den am häufigsten auftretenden Autoimmunerkrankungen (1;2). Die Krankheit tritt zumeist ab dem 30. bis 50. Lebensjahr auf, wobei Frauen doppelt so häufig erkranken wie Männer (3;4). Die Ätiologie der rheumatoiden Arthritis ist trotz intensiver Forschung noch immer unklar. Auch wenn sie oft als eine Autoimmunerkrankung bezeichnet wird, sind deren Ursachen vielfältig (5). Hinsichtlich einer genetischen Disposition wurden in den letzten Jahren einige Suszeptibilitätsgene für die RA beschrieben. Insbesondere HLA (*human leukocyte antigen*) Klasse II Alloantigene, die ein sogenanntes *shared epitope* aufweisen, werden mit einem erhöhten Risiko für RA in Verbindung gebracht. Diese Allele enthalten eine bestimmte Aminosäuresequenz auf der DR- β Kette des HLA Klasse II Moleküls (6-8). Auch mikrobielle Stimuli, wie *Mycobacterium Tuberculosis*, *Escherichia Coli*, Mykoplasmen oder auch Retroviren und das Epstein-Barr-Virus stehen in Verdacht, den Ausbruch der Krankheit zu begünstigen (9;10). Rauchen, Übergewicht und Stress gelten ebenfalls als Risikofaktoren (11-13). Aus immunologischer Sicht wird die RA als eine Autoimmunerkrankung betrachtet, die durch einen Toleranzbruch gegenüber körpereigenen Strukturen (Autoimmunität) ausgelöst wird. Dass der RA Mechanismen der Autoimmunität zugrunde liegen, wurde durch die Entdeckung von Autoantikörpern im Patientenserum erkannt. Zunächst wurden Autoantikörper, die gegen den Fc-Teil der Immunglobuline G (IgG) gerichtet sind, so genannte Rheumafaktoren (RF), detektiert. Diese treten in erster Linie als IgM- RF, aber auch als IgG- und IgA-RF im Patientenserum auf und bilden Immunkomplexe, die das Komplementsystem im Gelenk aktivieren (14). Dies führt zur Freisetzung chemotaktischer Faktoren, die ihrerseits immunkompetente

Effektorzellen in das sonst wenig zelluläre Synovium rekrutieren. Rheumafaktoren werden jedoch auch bei Infektionskrankheiten und anderen Autoimmunerkrankungen festgestellt und können somit nicht als alleiniger Auslöser der RA angesehen werden. Ein weiterer Autoantikörper, der zu 60–70 % in Gelenken von RA-Patienten auftritt, ist gegen zyklisch citrullinierte Peptide gerichtet (5). Die posttranslationale Citrullinierung von Proteinen gilt als physiologischer Prozess, der für die Degradation intrazellulärer Proteine während der Apoptose von Bedeutung ist. Dennoch werden citrullinierte Antigene nicht nur in Gelenken von RA-Patienten gefunden, sondern auch im Synovialgewebe von Patienten mit anderen entzündlichen Gelenkerkrankungen. Demnach muss bei der RA ein spezifischer Mechanismus vermutet werden, der zur Autoreaktivität bzw. zum Toleranzbruch gegenüber citrullinierten Proteinen führt (15;16). Weitere krankheitsassoziierte Autoantigene sind Knorpel-Proteoglykane, Kollagen Typ II, Glucose-6-Phosphat Isomerase und Hitzeschock-Proteine (17). Autoantikörper und Rheumafaktoren werden von B-Zellen und Plasmazellen gebildet und sind oft schon Jahre vor Auftreten der ersten klinischen Symptome im Serum nachweisbar (5;18). Eine Hypothese zur Initiierung der inflammatorischen Vorgänge im Synovium ist demnach das oben beschriebene Vorhandensein von Autoantikörpern in Knorpel, Knochen und Synovium. Der Mechanismus der Gelenkzerstörung und daran beteiligte Zytokine sind in Abbildung 1 dargestellt. Die durch Rheumafaktoren induzierte Aktivierung des Komplementsystems führt zu einer massiven Infiltration des Synoviums durch T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten, die lokal proliferieren und inflammatorische Zytokine und Chemokine produzieren können. Zusätzlich fördern Wachstumsfaktoren eine Neovaskularisation, was Zellmigration fördert und weitere Effektorzellen in das Gelenk lockt. Durch diesen Prozess entsteht ein Zytokinmilieu im Gelenk, das synoviale Fibroblasten und Osteoklasten aktiviert, welche durch Synthese von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und Kathepsinen entscheidend am Abbau von Knorpel und Knochen beteiligt sind (19). Die chronische Entzündung führt zu einer Verdickung der Synovialmembran. Die Deckzellschicht, das sogenannte *lining layer*, kann auf bis zu acht Zellschichten anwachsen und so einen Pannus bilden der in den Knorpel und subchondralen Knochen einwächst und diese so zerstört (20). Diese Verdickung ist sowohl durch Hyperplasie und Proliferation der Synoviozyten bedingt, als auch durch das Einwandern von Immunzellen wie Monozyten und Lymphozyten (21;22).

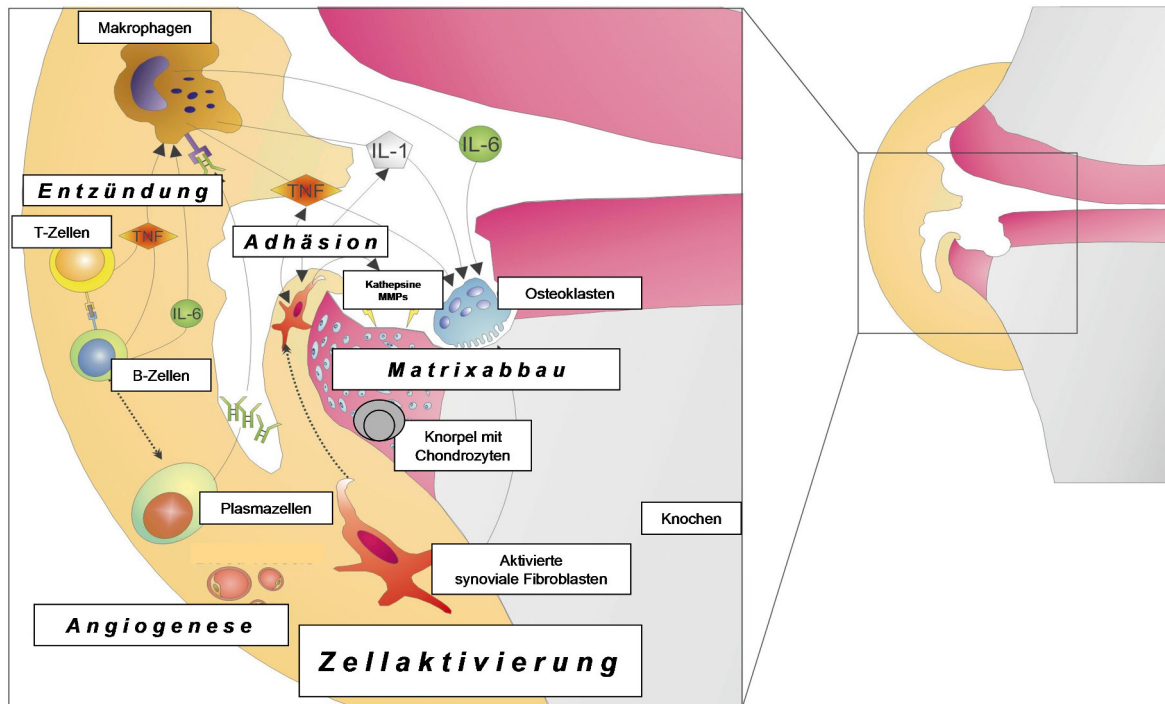


Abbildung 1: Mechanismus der Gelenkzerstörung bei rheumatoider Arthritis
(Modifiziert nach Neumann et al. 2004, Curr. Opin. Rheumatol.)

In Gelenken von RA-Patienten konnte außerdem das Zytokin IL-17 nachgewiesen werden. IL-17 wird von Th17-Zellen produziert und stimuliert Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, Osteoklasten und Chondrozyten zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und trägt so ebenfalls zur Zerstörung des Gelenks bei (5;23). Des Weiteren wurden in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten vermehrt regulatorische T-Zellen (Treg) gefunden. Diese Zellen dämpfen Entzündungsprozesse ein, sind jedoch dazu in der RA nicht mehr in der Lage (5).

Außerdem gelangen während der ausgeprägten lokalen Entzündungsreaktion große Mengen immunkompetenter Zellen und Entzündungsmediatoren (z. B. Zytokine) in die Peripherie. Dadurch wird eine systemische Reaktion mit Aktivierung der antiinflammatorischen Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren-Achse (HHN- oder HPA-Achse) und der Hypothalamus-autonomes-Nervensystem (HANS-) Achse induziert, auf die in Abschnitt 1.2 näher eingegangen wird. Auch diese Veränderungen spielen bei der Pathogenese der RA eine entscheidende Rolle, da die Effektoren der endokrinen (u. a. Glukokortikoide) und der neuronalen Systeme (u. a. Noradrenalin) über systemische Rückkopplungskreise den lokalen synovialen Entzündungsprozess modulieren (24;25). Diese wirken u. a. durch Stimulation des IL-10 und Hemmung der TNF-Produktion antiinflammatorisch und immunsuppressiv. Aus klassischer Sichtweise ist diese kontrollierende Gegenregulation während einer Inflammation durch das neuroendokrine

System von entscheidender Bedeutung, um überschießende und systemische Auswirkungen einer lokalen Entzündungsantwort zu verhindern (26). Neueste Erkenntnisse demonstrieren gleichzeitig die Bereitstellung von Energiesubstraten durch die Aktivierung der HPA-Achse (Cortisol) und des SNS (Adrenalin, Noradrenalin). Auf diese Weise liefert das neuroendokrine System wichtige Energie für das aktivierte Immunsystem während des Entzündungsprozesses (27).

Im Allgemeinen existiert bezüglich auslösender Faktoren der rheumatoiden Arthritis gegenwärtig keine einheitliche Theorie. Um die Pathophysiologie der RA zu verstehen, müssen alle beteiligten Systeme (Immunsystem, endokrines System, Nervensystem) und deren Interaktionen betrachtet werden. Da die Untersuchung von Interaktionen der verschiedenen Systeme im Menschen nicht umsetzbar ist, wurden Tiermodelle der Arthritis entwickelt. Mit deren Hilfe können neue Erkenntnisse über Ätiologie und Pathogenese der Arthritis gewonnen und neue Therapieansätze untersucht werden. In dieser Arbeit wurde das Modell der Kollagen Typ II (CII)-induzierten Arthritis (CIA) verwendet und soll im Folgenden beschrieben werden.

1.1.1 Tiermodell der Kollagen Typ II-induzierten Arthritis

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden verschiedenste Arthritismodelle in Mäusen und Ratten beschrieben (28;29). So tritt zum Beispiel eine spontane Arthritis in TNF-transgenen Tieren oder im K/BxN Mausmodell auf (30;31). Immunologisch ausgelöst werden kann die Arthritis u. a. in dem Modell der Streptokokkenzellwand-induzierten Arthritis (32), der Adjuvant Arthritis (33), der Antigen induzierten Arthritis (28) und der CII induzierten Arthritis (34). Letzteres ist das am häufigsten verwendete Arthritismodell bei Mäusen (29). Die Kollagen Typ II-induzierte Arthritis (CIA) ist der humanen RA sehr ähnlich. Es werden sowohl Erytheme und Ödeme beobachtet, als auch Knorpel- und Knochenerosionen. Des Weiteren treten hohe Antikörpertiter der anti-Kollagen Typ II Antikörper (aCII) und auch Rheumafaktoren auf (35). Ausgelöst wird die CIA in Mäusen durch eine Immunisierung mit Typ II Kollagen, was die Hauptkomponente des Gelenkknorpels darstellt. Den Mäusen wird eine intradermale Injektion von Kollagen Typ II in komplettem Freund Adjuvant (CFA) in die Schwanzwurzel injiziert (36). Die Immunisierung mittels Kollagen Typ II zusammen mit Adjuvant induziert eine autoimmune Polyarthritis durch eine kreuzreaktive autoimmune Antwort gegen das Kollagen Typ II im Gelenkknorpel (37). Die Immunantwort gegen das Typ II Kollagen ist

sowohl durch eine Stimulation von Kollagen-spezifischen T- und B-Zellen, als auch durch die Antikörperproduktion, die gegen das Kollagen II gerichtet ist, gekennzeichnet (38). Die Komplementaktivierung stellt ebenfalls einen wichtigen Bestandteil der Pathogenese der CIA dar, da gezeigt werden konnte, dass Komplementfaktor C3- oder C5-defiziente Mäuse nicht erkrankten, obwohl aCII Antikörper im Serum detektierbar waren (39;40). Im Tiermodell der CIA besteht wie bei der humanen RA eine genetische Assoziation zu MHC Klasse II Genen. Die Immunantwort der Tiere kann als klassische Th1-Antwort eingestuft werden, da hauptsächlich Th1 Zytokine wie Interferon-gamma (IFN- γ) und Interleukin-2 (IL-2), im Gegensatz zu Th2 Zytokinen (IL-4, IL-10), von T-Zellen sezerniert werden (41). Die Übereinstimmungen der Pathogenese von CIA und der humanen RA wurden in mehreren Übersichtsarbeiten veröffentlicht (41;42). Die Arbeit von Burkhardt und Kollegen hat gezeigt, dass in der RA die Autoantikörperantwort gegen eine evolutionär konservierte Kollagen II Struktur gerichtet ist, die ebenfalls in Mausmodellen der Arthritis als Epitop erkannt wird (43). Das Mausmodell der Kollagen Typ II induzierten Arthritis ist somit in hohem Maße zur Untersuchung des Krankheitsprozesses geeignet.

1.2 Neuroendokrine Veränderungen bei rheumatoider Arthritis

Wie schon im Abschnitt 1.1 erwähnt wurde, hat der Entzündungsprozess im Gelenk durch zirkulierende Immunzellen und Zytokine die Aktivierung der antiinflammatorischen HPA- und der HANS-Achse zur Folge. Die Effektoren der beiden Achsen, nämlich Cortisol (HPA-Achse) und Adrenalin/Noradrenalin (SNS) würden das Entzündungsgeschehen normalerweise eindämmen, sind aber im Verlauf der RA dazu nicht mehr in der Lage, da sowohl ein Funktionsverlust der HPA-Achse (44), als auch ein erhöhter Sympathikustonus (45) bei gleichzeitigem Verlust sympathischer Nervenfasern im Synovium auftritt (46-48). Diese neuroendokrinen Veränderungen werden im Folgenden genauer erläutert.

1.2.1 Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse (HPA-Achse)

Auf inflammatorische Stimuli reagiert das zentrale Nervensystem (ZNS) mit der Aktivierung der HPA-Achse, und ist somit in der Lage, primäre und sekundäre lymphatische Organe zu beeinflussen (49). Während einer peripheren Immunreaktion wird

dem ZNS über Immunmediatoren und afferente sensible Nervenfasern eine proinflammatorische Situation signalisiert. Die Reaktionen des ZNS auf Entzündungsinformationen werden dabei prinzipiell auf drei Wegen gebahnt: Bei selektiver Aktivierung verschiedener Areale oder Loci (Locus ceruleus) durch afferente Nervenbahnen wird der Parasympathikus aktiviert, dessen efferenter Vagusnerv Leber, Darm, Niere oder Herz erreicht und mit einer Ausschüttung von Acetylcholin reagiert. Die Wirkung des Sympathikus wird über die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin vermittelt. Zudem bewirkt die Aktivierung der HPA-Achse die Freisetzung des *corticotropin-releasing hormone* (CRH), das den Hypophysenvorderlappen zur Produktion des *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH) anregt, und so die Nebennierenrinde zur Glukokortikoidausschüttung stimuliert. Die Aktivierung der HPA-Achse kann mehrfach gegenreguliert werden (Abb. 2). Acetylcholin (lokal) und Glukokortikoide (Cortisol, systemisch) wirken u. a. durch Stimulation des IL-10 und Hemmung der TNF-Produktion antiinflammatorisch und immunsuppressiv (50).

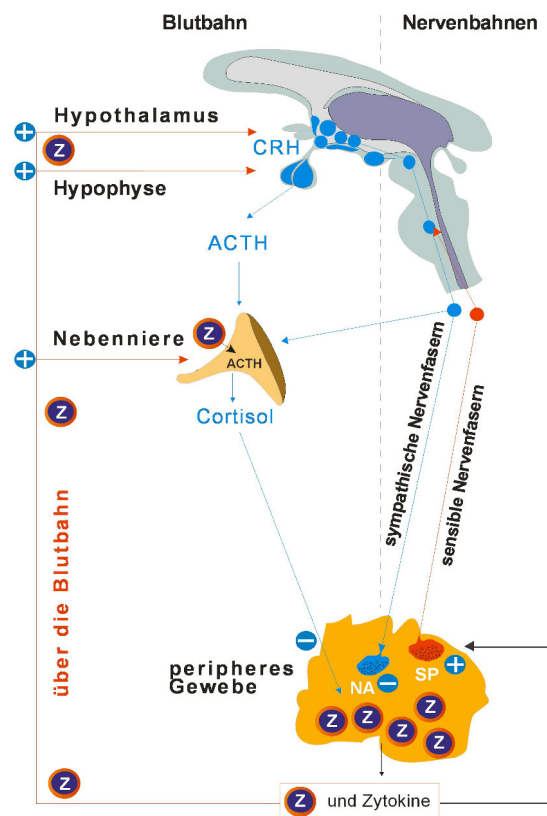


Abbildung 2: Antiinflammatorische Regelkreise während einer peripheren Entzündung

Über die Blutzirkulation wird das ZNS durch freigesetzte Zytokine stimuliert und so die HPA-Achse (links) und die Hypothalamus-Autonomes-Nervensystem-Achse (HANS-Achse, rechts) aktiviert. Die periphere Entzündung wird durch Effektoren beider Achsen (Cortisol und Noradrenalin) gehemmt. Abkürzungen: ACTH, Adrenocorticotropes Hormon; CRH, Corticotropin-releasing Hormon; NA, Noradrenalin; SP, Substanz P; Z, aktivierte Immunzelle. Modifiziert nach (50).

Während der akuten Krankheitsphase der RA bewirken proinflammatorische Zytokine (IL-6, IL-1, IL-2, TNF) eine Aktivierung der HPA-Achse, die zu diesem Zeitpunkt noch mit adäquater Hormonantwort und damit ausreichender Cortisolproduktion reagieren kann. Im Verlauf des Krankheitsprozesses bleibt dies jedoch aus, und es existieren unverhältnismäßig niedrige Cortisolspiegel relativ zum Ausmaß der Entzündung (51). Cortisol spielt aber nicht nur eine wichtige Rolle als Modulator des Immunsystems, sondern auch als Regulator des Intermediärstoffwechsels. Cortisolrezeptoren sind praktisch auf allen Zellen des Organismus ubiquitär exprimiert. Der Plasmacortisolspiegel unterliegt einem zirkadianen Rhythmus, der durch Rückkopplung auf Hypophyse und Hypothalamus reguliert wird. Cortisol wirkt synergistisch mit Glucagon und Katecholaminen als Gegenspieler des Insulins bei der Regulation des Plasmaglukosespiegels. Es verstärkt und verlängert den durch Glucagon oder Adrenalin hervorgerufenen Blutzuckeranstieg. Dieser Effekt kommt über eine Förderung der Gluconeogenese und Glykogenolyse in der Leber und über die gleichzeitige Hemmung der Glukoseaufnahme und des Glukoseverbrauchs im peripheren Gewebe wie Fettgewebe, Fibroblasten oder Lymphozyten zustande (52).

1.2.2 Das sympathische Nervensystem (SNS)

Das ZNS reagiert auf inflammatorische Reize nicht nur mit Aktivierung der HPA-Achse, sondern auch mit der Aktivierung der HANS-Achse (Abb. 2). In dieser Arbeit soll insbesondere das sympathische Nervensystem betrachtet werden, welches neben dem parasympathischen Nervensystem (PSNS) Bestandteil des autonomen Nervensystems ist. SNS und PSNS wirken antagonistisch und können einzelne Organe und sogar einzelne Kompartimente von Organen getrennt regulieren. Sie innervieren hauptsächlich Drüsen, glatte Muskulatur, Blut, Lymphgefäße und Lymphknoten, sowie Fett und Knochenmark (52). Die hauptsächlichen Neurotransmitter des SNS sind Noradrenalin und Adrenalin. Sie können konzentrationsabhängig verschiedene Rezeptoren auf ihren Zielzellen binden. Da das SNS primäre und sekundäre lymphatische Organe (SLOs) innerviert und viele Immunzellen Adrenorezeptoren (AR) exprimieren, vermag das SNS das Immunsystem zu regulieren (53). Auch das Synovium wird von sympathischen Nervenfasern innerviert und steht somit unter der Kontrolle des SNS (54-56). Außerdem werden Adrenalin und Noradrenalin auch durch sympathische Stimulation aus dem Nebennierenmark in die Blutbahn freigesetzt, um dort ihre Wirkung als freie Hormone zu entfalten. Sie gelten als klassische Stresshormone, die bei entsprechendem Bedarf eine Mobilisierung von

Energiereserven bewirken und Atmung, Herz- und Kreislauffunktion steigern. Ihre peripheren Wirkungen werden durch α - und β - Rezeptoren und deren Subtypen vermittelt. Die adrenergen Rezeptoren zählen zur Gruppe der G- Protein- gekoppelten Rezeptoren und werden in drei Gruppen eingeteilt: die $\alpha 1$ -Rezeptoren, $\alpha 2$ -Rezeptoren und β -Rezeptoren (52). Fast alle Zellen der spezifischen und unspezifischen Abwehr exprimieren funktionelle adrenerge Rezeptoren (57;58). Weitere Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems sind ATP/Adenosin, Opioid (β-Endorphin) und Neuropeptid Y. Für alle diese Neurotransmitter, die neben Noradrenalin aus sympathischen Nervenendigungen freigesetzt werden können, sind Rezeptoren auf Immunzellen nachgewiesen worden (57). Das sympathische Nervensystem nimmt im Kontext chronisch entzündlicher Erkrankungen wie der RA eine duale Rolle ein. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine frühe Sympathektomie in der asymptomatischen Phase die Arthritis mildert, wohingegen eine Verschlechterung des Schweregrades durch späte Sympathektomie (in der symptomatischen Phase) eintritt (59). In der frühen Phase wirkt das SNS proinflammatorisch und unterstützt die Entzündung, indem es u. a. Plasma Extravasation, die IL-17 Sekretion von Lymphknoten- und Milzzellen fördert (60) und die Migration, sowie Akkumulation von Leukozyten im Entzündungsgebiet fördert (59;61). In der späten Phase hat das SNS antiinflammatorischen Einfluss auf die Arthritis, welcher durch Katecholamin-produzierende Zellen ausgelöst werden könnte (59;62). Des Weiteren könnte das SNS die Entzündung durch Bereitstellung energiereicher Substrate fördern, da Katecholamine über das $\beta 2$ - AR Signaling Glukose und freie Fettsäuren für das aktivierte Immunsystem bereitstellen (27;63).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Arthritis in ATGL (Adipozyten Triglycerid Lipase)-defizienten Tieren untersucht werden. Mäuse des *Atgl* (-/-) Phänotyps ähneln β -adrenergen Rezeptor defizienten Mäusen in ihrer Unfähigkeit Fettsäuren aus Triacylglyceriden freizusetzen (64;65), d.h., wenn die ATGL nicht vorhanden ist, werden unzureichende Mengen an freien Fettsäuren als energiereiche Substrate für die mitochondriale oxidative Phosphorylierung produziert. ATGL- defiziente Mäuse akkumulieren Triacylglyceride in fast allen Geweben, was beweist, dass diese Lipase eine essentielle Rolle beim Fettabbau spielt. Der Phänotyp ATGL- defizienter Mäuse äußert sich außerdem in erhöhtem Körpergewicht und Fettmasse, sowie Fettakkumulation in verschiedenen Geweben. Die Thermogenese dieser Tiere ist gestört und die Werte des Plasma-Cholesterols, der Plasma-Fettsäuren, sowie Plasma-Triacylglyceride sind erniedrigt, weil die Lipolyse-abhängige Energiebereitstellung nicht funktioniert (66).

1.3 Energieregulation bei chronisch entzündlichen Erkrankungen

Die Synthese, Transport und Speicherung von Molekülen (z.B. Proteine wie Zytokine, Antikörper) und dazugehöriger zellulärer Signalwege sind direkt abhängig von der Verfügbarkeit und Verwertung energiereicher Substrate wie Kohlenhydrate, Proteine und Fettsäuren. Die Synthese einzelner Moleküle ist sehr kostspielig. So erfordert die Generierung eines typischen Proteins 2300 ATP (Adenosintriphosphat) Moleküle, bzw. 5 ATP Moleküle pro Peptidbindung (67). Dieser Sachverhalt zeigt, dass die Verfügbarkeit energiereicher Substrate für grundlegende molekulare Mechanismen unabdingbar ist. Das trifft ebenfalls auf inflammatorische Prozesse zu, da schon das ruhende Immunsystem einen beträchtlichen Energiebedarf von bis zu 20 % des Grundumsatzes, ähnlich wie das Gehirn und der ruhende Muskel aufweist ((27) s. Abb. 3). Betrachtet man entzündliche Erkrankungen wie die RA, so steigt der Energiebedarf des aktivierten Immunsystems weiter an. Berechnungen zeigen, dass das aktivierte Immunsystem ungefähr 25-30 % des Grundumsatzes benötigt (Abb. 3). Ebenfalls ist bekannt, dass kleine Operationen eine Aktivierung von Leukozyten bewirken, welche den Grundumsatz um 10% steigert. Eine Erhöhung des Grundumsatzes um 15-30 % entsteht im Rahmen einer Knochenbruch-Heilung, eine Sepsis steigert ihn um 50 % und durch großflächige Verbrennungen wird eine Steigerung des Grundumsatzes um bis zu 100 % und mehr erreicht (68).

Diese Berechnungen zeigen, dass die Aktivierung des Immunsystems energetisch betrachtet sehr kostspielig ist und die Energiebereitstellung genauestens reguliert werden muss, um Entzündungsreaktionen zu „nähren“ und Reparaturprozesse aufrecht zu erhalten (27).

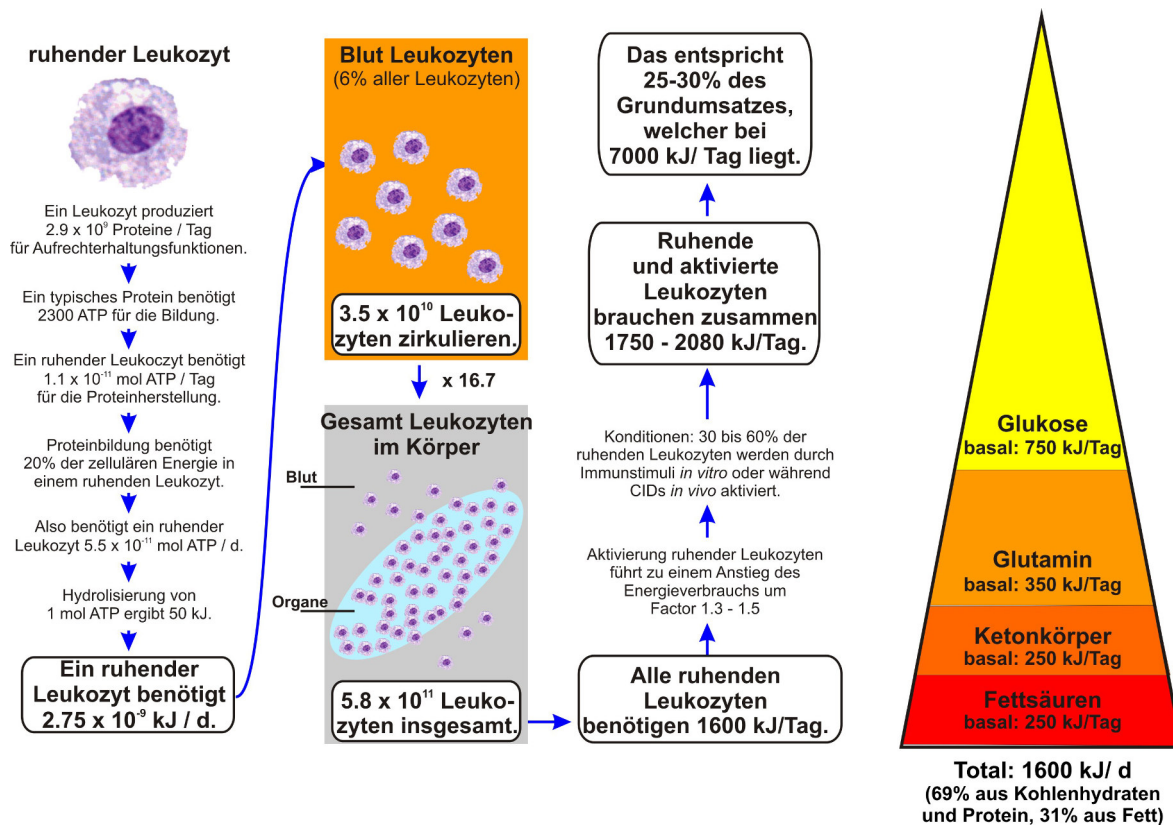


Abbildung 3: Geschätzter Energiebedarf von Leukozyten pro Tag

In den Originalarbeiten wurden Leukozyten entweder mit Concavalin A aktiviert, oder von Patienten mit rheumatischen Erkrankungen bzw. Infektionskrankheiten entnommen. Zum Vergleich: der Grundumsatz eines Gesunden beträgt rund 10.000 kJ/Tag, der eines Tour de France Fahrers (Schwerstarbeiter) rund 30.000 kJ/Tag. Der Speicher energiereicher Substrate ist zum Großteil durch Fettgewebe gegeben (rund 500.000 kJ/Tag). Rechts ist der Energieverbrauch von Immunzellen gezeigt. Diese verwerten Glukose, Glutamin, Ketonkörper und freie Fettsäuren zu unterschiedlichen Anteilen, wobei Glukose und Glutamin die Hauptquellen darstellen. Modifiziert nach (27).

Bisherige Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der systemischen Energieregulation und Bioenergetik bei Inflammation zeigen, dass wichtige ATP-generierende Signalwege, wie die Induktion des *uncoupling proteins*, zu einer deutlichen Verbesserung der Entzündung bei Glomerulonephritis führt (69). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Wechsel von aerober Glykolyse zur Glukose-Oxidation durch Stimulation des Enzyms Pyruvat-Dehydrogenase die experimentelle Arthritis verbessert (70). Es konnte auch gezeigt werden, dass über die Aktivierung der AMPK ATP-generierende Signalwege eingeschaltet werden und die experimentelle Autoimmunenzephalitis (Tiermodell der multiplen Sklerose) milderte (71). Diese Befunde zeigen die Bedeutung der generellen Energieregulation und der zellulären Bioenergetik für chronisch entzündliche Krankheitsprozesse. Die Energieregulation muss in zwei Bereiche unterteilt werden. Zum einen betrachtet man die systemische Energieregulation, die im Gesunden der Speicherung

energiereicher Substrate dient, und zum anderen schaut man auf die zelluläre Bioenergetik mit Stoffwechselwegen, die Energiesubstrate bilden bzw. verwerten.

1.3.1 Systemische Energieregulation

Unter nicht-entzündlichen Bedingungen und bei normaler Nahrungsaufnahme werden Nährstoffe in Leber und Muskel als Glykogen, im Fettgewebe als Triglyceride und als Protein im Muskel gespeichert. Während des Entzündungsprozesses, insbesondere während eines lange andauernden, chronischen Entzündungsprozesses, muss eine Bereitstellung energiereicher Substrate erfolgen, um die Inflammation zu unterstützen (27). Diese Umverteilung der Substrate führt zu mehreren Veränderungen der systemischen Energieregulation. So wird durch die Entzündung die HPA-Achse und das SNS aktiviert, was zur Freisetzung von Fettsäuren aus dem Fettgewebe, Glukose aus der Leber, sowie Protein aus dem Muskel führt, die dann als Substrate für das aktivierte Immunsystem dienen (Abb. 4).

führt zu mehreren Veränderungen der systemischen Energieregulation. So wird durch die Entzündung die HPA-Achse und das SNS aktiviert, was zur Freisetzung von Fettsäuren aus dem Fettgewebe, Glukose aus der Leber, sowie Protein aus dem Muskel führt, die dann als Substrate für das aktivierte Immunsystem dienen. Die Energieumverteilung zu Gunsten des aktivierten Immunsystems führt zu vielen Folgeerkrankungen. Dazu zählen u. a. Anorexie, Kachexie, Insulinresistenz, erhöhter HPA- und SNS- Tonus, Anämie, Vitamin D Mangel oder Osteopenie (27;61;72).

1.3.2 Zelluläre Bioenergetik

Der wichtigste Aspekt der zellulären Energieregulation ist die ATP-Synthese. Diese erfolgt über die Hauptstoffwechselwege der Glykolyse, Proteolyse und Beta-Oxidation von Fettsäuren, die letztendlich im Citratzyklus in der mitochondriellen Matrix enden, wo sich die Atmungskette als wichtiger Teil des Energiestoffwechsels befindet. Durch NADH und FADH_2 angelieferte Elektronen bzw. angelieferter Wasserstoff werden mit Hilfe einer Reihe hintereinander geschalteter Redoxkomplexe in der inneren Mitochondrienmembran dazu genutzt, aus ADP und Phosphat die universelle Energiewährung der Zelle, ATP, zu synthetisieren. In Komplex IV der Atmungskette wird Sauerstoff zu Wasser reduziert, bevor die ATP-Synthase ATP produziert. Der Sauerstoffverbrauch ist also direkt mit dem Energieverbrauch verknüpft. Die an die Wasserstoff- und Elektronenüberträger NADH und FADH_2 gebundenen Elektronen stammen aus dem Citratzyklus, der Glykolyse und dem Abbau der Fettsäuren (Abb. 5).

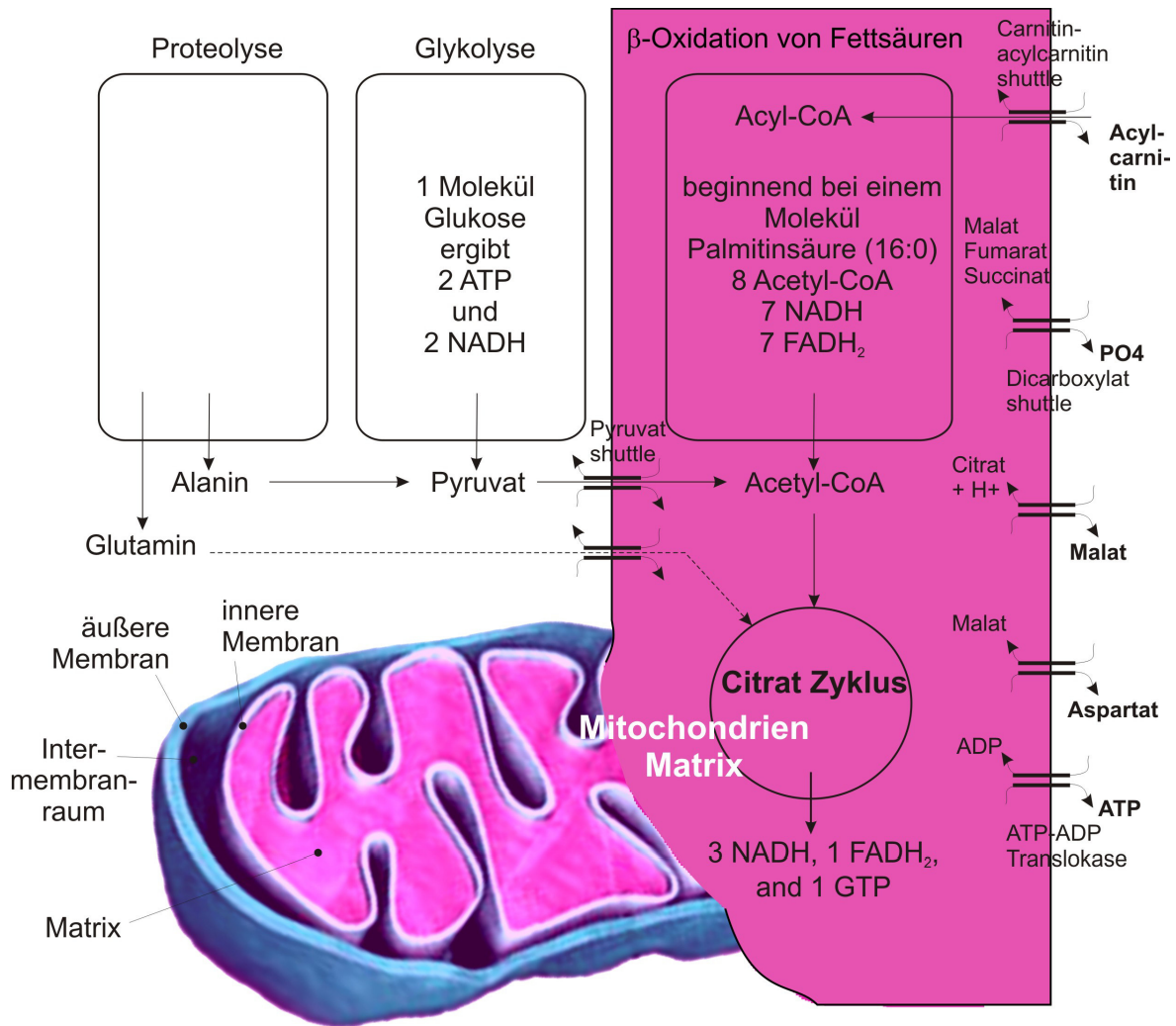


Abbildung 5: ATP-Synthese durch Verwertung energiereicher Substrate (Proteine, Glukose, Fettsäuren)

Schematisch gezeigt ist die ATP-Synthese über die Hauptstoffwechselwege der Proteolyse, Glykolyse und β -Oxidation von Fettsäuren. Alle Pfade enden im Citratzyklus in der mitochondriellen Matrix. Auf diese Weise werden die Reduktionsäquivalente NADH und FADH₂ recycelt und weiter in die Redoxkomplexe der Atmungskette eingespeist. Die verschiedenen Shuttlesysteme sind nötig, um die Substrate zwischen Zytosol und mitochondrieller Matrix zu transportieren. Abkürzungen: NADH, Nicotinamadenindinukleotid, FADH₂, Flavinadenindinukleotid.

Der weitaus größte Teil der Energiegewinnung des Organismus erfolgt innerhalb der Mitochondrien durch Kopplung von Wasserstoff- bzw. Elektronentransport an die ATP-Bildung aus ADP und anorganischem Phosphat, der oxidativen Phosphorylierung. Rund 90% des ATP wird durch diese oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien produziert. In den Mitochondrien laufen zwei miteinander gekoppelte Vorgänge ab, nämlich die Reoxidation wasserstoffübertragender, reduzierender Coenzyme mit Sauerstoff unter Wasserbildung und darüber hinaus die Fixierung der bei diesem exergonen Vorgang freiwerdenden Energie in Form von ATP. Die Atmungskette liegt in vier

Multienzymkomplexen vor, die den Wasserstoff- bzw. Elektronentransport katalysieren. Elektronen werden dabei von Elektronen-Donatoren auf Elektronen-Akzeptoren über 4 Redoxkomplexe (I bis IV) geleitet. Im Komplex IV endet die Elektronenübertragung beim terminalen Elektronenakzeptor Sauerstoff, der zu Wasser reduziert wird, bevor schließlich von der ATP-Synthase ATP generiert wird (52).

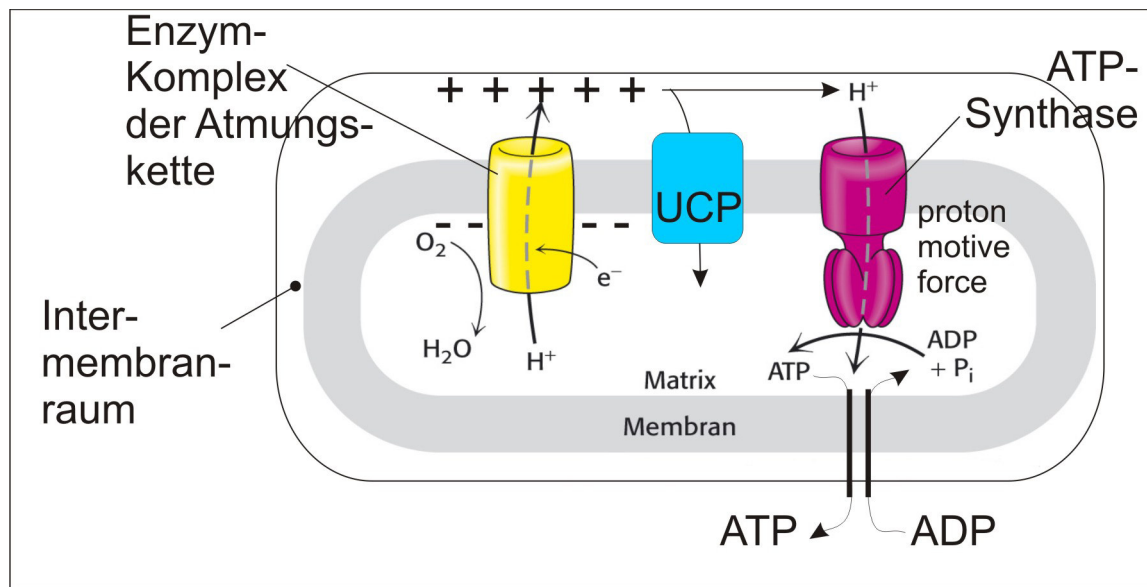


Abbildung 6: Das Prinzip der oxidativen Phosphorylierung

Schematisch dargestellt ist das Mitochondrium mit innerer und äußerer Membran und dem Intermembranraum. Die Komplexe der Atmungskette transportiert Protonen (H^+) von NADH und $FADH_2$ in den Intermembranraum, was zu einem Protonengradienten führt. Hier dargestellt ist Komplex IV der Atmungskette, welcher Sauerstoff verbraucht, bzw. zu Wasser reduziert. Schließlich werden die Protonen durch die ATP-Synthase geschleust, wobei aus ADP ATP gebildet wird. Entkopplerproteine (uncoupling proteins, UCP) können die ATP-Synthase umgehen und Wärme produzieren.

Die oben erläuterten Pfade können durch verschiedene Hemmstoffe oder Entkoppler beeinflusst werden. Auf diese Weise kann der Einfluss bestimmter Stoffwechselwege während der Entzündung untersucht werden. Hemmstoffe, die die oxidative Phosphorylierung blockieren, sind zum Beispiel Rotenon (Inhibition von Komplex I), Oligomycin (Inhibitor der ATP-Synthase) und Antimycin A (Inhibition von Komplex III). Die Quintessenz dieser Blockade ist ein reduzierter zellulärer ATP-Gehalt (73). Die Wirkung von Entkopplern besteht darin, die Oxidationsvorgänge innerhalb der Atmungskette von Phosphorylierungsvorgängen abzutrennen. Als Resultat entwickelt sich eine unkontrollierte Atmung, bei der das Angebot an ADP oder anorganischem Phosphat nicht länger die Atmungsgeschwindigkeit bestimmt. Entkoppler sind generell lipophile organische Verbindungen, die leicht protoniert bzw. deprotoniert werden können. Dies führt zu einem Zusammenbruch des über der inneren Mitochondrienmembran aufgebauten

elektrochemischen Potentials und damit trotz funktionierendem Elektronentransport zum Stopp der ATP-Bildung durch oxidative Phosphorylierung. Dazu zählen u. a. 2,4-Dinitrophenol (DNP) oder FCCP (Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon) (73;74).

1.3.3 Sauerstoffverbrauchsmessungen als Maß des Energieverbrauchs

Die obigen Erläuterungen zeigen, dass der Sauerstoffverbrauch direkt mit dem Energieverbrauch verknüpft ist. Somit kann der Energieverbrauch (und die ATP-Synthese) über Messungen des Sauerstoffverbrauchs realisiert werden. Dabei entspricht 1 Liter Sauerstoff (= 0,04463 mol O₂, bzw. 1,429 g O₂) 0,4 mol ATP. Vorausgehende Studien haben beschrieben, wie die Messung des Sauerstoffverbrauchs zur Bestimmung des Energieverbrauchs in Form von ATP genutzt werden kann (75). Es konnte gezeigt werden, dass der Sauerstoffverbrauch von Rattenthymozyten 4,12 nmol/min beträgt, was 36,2 nmol ATP/min entspricht. Der Verbrauch stieg nach Stimulation der Thymozyten innerhalb von Sekunden um 31% an. Im Rahmen dieser Studie wurden verschiedene Inhibitoren einzelner Pfade eingesetzt, um den spezifischen Anteil des Energieverbrauchs von Proteinsynthese, Natrium/Kalium ATPase, Calcium ATPase, RNA/DNA Synthese und Protonenfluss über der inneren Mitochondrienmembran zu bestimmen (75). Weitere Untersuchungen haben über die Messungen des Sauerstoffverbrauchs demonstriert, wie viele ATP Moleküle für die Synthese eines Proteins nötig sind (67). Die Messung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte in den letzten Jahrzehnten üblicherweise mit der Clark Elektrode in Zellsuspension (67;75;77). Diese sind jedoch für angestrebte Hochdurchsatzmessungen nicht geeignet (78). *In vivo* Messungen sind hinsichtlich der Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs, des Luftdruckes und der Temperatur sensitiver (beschrieben in (79;80)) und können auch mittels indirekter Kalorimetrie realisiert werden, geben jedoch keinen Aufschluss über den Energiebedarf einzelner Organe. Der Sauerstoffverbrauch in Zell- oder Gewebekultur kann kontinuierlich und nicht-invasiv mit Hilfe des Sensor Dish ® Reader der Firma PreSens GmbH (Regensburg, Deutschland) gemessen werden. Dieses System bietet die Möglichkeit von Hochdurchsatzmessungen im 24-well Format (81-84). Es wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet.

1.3.4 Temperaturperzeption und Energieumverteilung

Die Temperaturperzeption ist für das Überleben eines Organismus sowie für die zelluläre und metabolische Homöostase lebensnotwendig. Thermale Stimuli werden in afferenten Nerven von Ionenkanälen der *transient receptor potential* (TRP) Familie detektiert (85). Der Kälte- und Menthol-Rezeptor TRPM8 wird durch Kältereize (~ 28°C bis ca. 10°C, angenehm kühl bis schmerzhaft kalt) aktiviert und ist auf den Spinalganglien sowie in trigeminalen Neuronen in der Peripherie lokalisiert (86). Neben seiner wichtigen Funktion bei der Thermoregulation, ist der TRPM8-Rezeptor auch bei pathologischen Vorgängen wie Asthma oder Krebs beteiligt (87). Ein potenter Agonist dieses Rezeptors ist das Icilin. Icilin induziert das Gefühl „Kälte“, was bei Nagetieren starke stimulatorische Effekte, wie Hyperthermie, Hyperaktivität, exzessive Fellpflege, sowie Kältezittern („*wet dog shakes*“) hervorruft (88). In einem chronischen Schmerzmodell der Ratte konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des TRPM8 Analgesie hervorruft (89). Eine systemische Icilin-Behandlung suggeriert durch Aktivierung kältesensitiver afferenter Neurone eine Senkung der Außentemperatur. Das dadurch induzierte Kältezittern bewirkt eine starke Energieumverteilungsreaktion: Da die Energie für Wärmeproduktion verloren geht, steht diese nicht länger dem Immunsystem zur Verfügung und die Tiere sollten eine mildere Arthritis entwickeln. Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die Körpertemperatur der Tiere innerhalb von 90 Minuten nach intramuskulärer Icilin-Injektion um 1 bis 2 °C ansteigt (88). Die intraperitoneal verabreichte Icilin-Dosis reicht in verschiedenen Publikationen von 1-60 mg/kg Körpergewicht (86;88;90;91). Die rektale Temperaturmessung ist für Mäuse sehr stressvoll (92). Von daher empfiehlt es sich, die Körpertemperatur mittels programmierbarer Temperatur-Transponder (BMDS; IPTT-300) zu messen (93). Der Hauptfokus der Betrachtungen im Rahmen dieser Arbeit lag allerdings auf der Modulation der Arthritis.

1.4 Mechanismen des Homing von Immunzellen

Als systemisches Organ ist das Immunsystem von einer beständigen Wanderung der Immunzellen zwischen ihren Wirkungsstätten abhängig. So müssen neu gebildete Lymphozyten aus dem Knochenmark (B-Zellen) und Thymus (T-Zellen) in das Blut gelangen, um die sekundären lymphatischen Organe (SLOs) Milz, Lymphknoten (LN) und Peyer'sche Platten (PP) zu erreichen. Der Eintritt vom Blut in Gewebe wird durch ein

Mehrschritt-Modell realisiert. Dieses umfasst initiales Rollen der Zellen entlang des Endothels, gefolgt von einer durch Chemokine ausgelösten Integrinaktivierung, fester Adhäsion und Migration durch das Endothel (94). Nach mehrstündigem Aufenthalt verlassen die Zellen die SLOs und patrouillieren als naive Zellen zwischen Blut, den lymphatischen Organen und den Lymphgefäßen durch den Körper, um im Falle einer Infektion aktiviert zu werden und als Effektorzellen an der Bekämpfung von Pathogenen im Gewebe teilzuhaben. Der Austritt (Egress) aus der Milz erfolgt ins Blut, aus den LN und PP in das Lymphgefäßsystem und dann ins Blut (94).

1.4.1 Zelladhäsionsmoleküle und ihre Rezeptoren im Kontext der Migration aus dem Gefäßsystem

Bei ihrer Zirkulation überwinden die Zellen ständig Barrieren von Endothelien, dabei wird der Schritt aus den Blutgefäßen heraus als Extravasation bezeichnet. Die einzelnen Schritte der Extravasation sind im so genannten Multistep-Modell (Mehrschritt-Modell) für Lymphknoten charakterisiert. Bei der Wanderung von Leukozyten aus den Blutgefäßen heraus nehmen die Zellen zunächst beim Rollen einen losen Kontakt mit dem Endothel auf. Dieser Schritt wird vor allem durch Selektine vermittelt (95). Bei dieser transienten Interaktion mit dem Endothel werden auf dem Endothel präsentierte Chemokine erkannt (96;97), was zu einer Aktivierung der Integrine führt. Daraufhin verändern die Integrine ihre Affinität bzw. Avidität und vermitteln eine feste Adhäsion am Endothel (95;98). Im letzten Schritt des Multistep-Modells, der sogenannten Diapedese, transmigrieren die Leukozyten durch das Endothel aufgrund chemotaktischer Signale zu bestimmten Kompartimenten im Gewebe (Abb. 7). In dieser Arbeit wurde die Rolle des L-Selektins (CD62L), LFA1 (CD11a), CCR7 und CCL21 untersucht. Daher wird im Folgenden auf diese genauer eingegangen.

Das Rollen von Leukozyten am Endothel wird über Selektine vermittelt. Diese sind eine Familie von Ca^{2+} -abhängigen membrangebundenen Lektinen. Die drei bekannten Selektine sind L-Selektin, P-Selektin und E-Selektin (99). L-Selektin wird von den meisten Leukozyten exprimiert und bindet an sogenannte vaskuläre Adressine. Dazu gehören die Moleküle GlyCAM-111 und CD34 auf postkapillären Venolen mit hohem Endothel (HEVs) im Lymphknoten (100).

1.4.2 Egress von Lymphozyten aus lymphatischen Organen

In den letzten Jahren wurde das Sphingosin-1-Phosphat (S1P) als zentraler Mediator des Egress von Lymphozyten aus sekundären lymphatischen Organen beschrieben (104;105). Es wird über den Sphingomyelinmetabolismus synthetisiert, wobei die wichtigsten Enzyme die Sphingosinkinase, S1P-Lyase und S1P-Phosphatase sind (106). Die Hauptquelle des Plasma S1P sind Thrombozyten, die S1P nach Aktivierung sezernieren (107). S1P ist außerdem bei wichtigen zellulären Prozessen wie Angiogenese, Proliferation und Apoptose beteiligt (108;109). Die Analyse des Wirkmechanismus des S1P Rezeptor-Antagonisten FTY720 (Fingolimod) konnte zeigen, dass die S1P – S1P1 (S1P Rezeptor 1) Interaktion eine entscheidende Rolle für den Egress von Lymphozyten aus sekundären lymphatischen Organen und aus dem Thymus spielt (110-112). Fingolimod hält Lymphozyten in SLOs und Thymus zurück und erwies sich bereits als effektive Therapie der multiplen Sklerose (113;114). Es wird angenommen, dass FTY720 die Infiltrationsrate antigen-spezifischer T-Zellen in transplantierte Organe oder den Entzündungsort von chronisch inflammatorischen Krankheiten verringert und auf diese Weise immunmodulatorisch wirkt (115). Der Austritt aus Lymphknoten benötigt S1P Rezeptoren auf Lymphozyten, sowie einen S1P Gradienten, der auf der Egressseite (Gefäßlumen) hoch und im Lymphknotenparenchym niedrig ist (104). Es sind fünf S1P Rezeptoren bekannt (S1P1- S1P5), wobei S1P an die Rezeptoren 1, 3, 4 und 5 binden kann (116;117). Die Rezeptoren 1 und 4 werden von Lymphozyten exprimiert (118). Diese Beobachtungen legen nahe, dass Sphingosin-1-Phosphat und seine Rezeptoren bei der Regulation des Gesamtlymphozytengehalts in Lymphknoten eine entscheidende Rolle spielen.

1.5 Zielsetzungen und Fragestellungen

Der Fokus dieser Arbeit lag auf Untersuchungen zur Energieregulation bei experimenteller Arthritis. Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass die Aktivierung des Immunsystems, insbesondere im Verlauf chronisch entzündlicher Erkrankungen sehr kostspielig ist und genauestens reguliert werden muss, um das aktivierte Immunsystem zu nähren. Im ersten Versuchsblock sollten neue Erkenntnisse über die Einflussnahme der Energieregulation auf die Arthritis untersucht werden. Der Energieverbrauch in verschiedenen Organen im Verlauf der Arthritis, verglichen mit Kontrolltieren, wurde bisher noch nicht untersucht. Es wurde erwartet, dass hauptsächlich die lymphatischen Organe (Milz, Thymus,

Lymphknoten) einen gesteigerten Energiebedarf zeigen, da diese Brutstätten der klonalen Vermehrung von Immunzellen sind. Dennoch ist es wahrscheinlich, dass auch andere Organe ins Krankheitsgeschehen involviert sind, die bisher nicht im Fokus der RA-Forschung standen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine neue Hochdurchsatz-Methode zur *in vitro* Messung des Energieverbrauchs etabliert werden. Der Sauerstoffverbrauch als Maß des Energieverbrauchs in Zellen kann mit einer kontinuierlichen Messmethode der Firma PreSens GmbH aus Regensburg realisiert werden. Auf diese Weise sollte eine Energieverbrauchskarte der einzelnen Organe erstellt werden, die Bereiche mit hohem bzw. niedrigem Energiebedarf während der Krankheit aufzeigt („SEEC“- *the spatial energy expenditure configuration*) und unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Auf dem Boden dieser Erkenntnisse erwarten wir neue therapeutische Möglichkeiten, die sich möglicherweise durch eine gezielte Beeinflussung der Energieumverteilungsreaktion und der zellulären Bioenergetik erreichen lassen. Folgende Versuchblöcke sollten zur Klärung der Energiebereitstellung bei Arthritis bearbeitet werden:

1. Block: Bedeutung des Sympathikus

Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass eine frühe Sympathektomie, d.h. Ausschaltung des sympathischen Nervensystems, die Arthritis mildert (59). Inwiefern die Krankheitsmilderung mit verminderter Energiebereitstellung für das aktivierte Immunsystem zusammenhängt, soll durch die Sauerstoffverbrauchsmessungen im Arthritisverlauf über 55 Tage geklärt werden. Die Sympathektomie wird mittels 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) induziert, welches sympathische Neuronen längerfristig zerstört.

2. Block: Bedeutung der Lipolyse

Mäuse des *Atgl*^(-/-) Phänotyps ähneln β -adrenergen Rezeptor defizienten Mäusen in ihrer Unfähigkeit Fettsäuren aus Triacylglyceriden freizusetzen, d.h., wenn die ATGL nicht vorhanden ist, werden unzureichende Mengen an freien Fettsäuren als energiereiche Substrate für die mitochondrielle oxidative Phosphorylierung produziert. Insofern sollte der Energieverbrauch bei *Atgl*^(-/-) Mäusen und die Krankheitsaktivität deutlich reduziert sein, was hier im Krankheitsverlauf getestet werden soll.

3. Block: Aufzeigen einer therapeutischen Perspektive durch gezielte Energieumverteilung

Eine systemische Icilin-Behandlung suggeriert durch Aktivierung kältesensitiver afferenter Neurone eine Senkung der Außentemperatur. Das dadurch induzierte Kältezittern bewirkt eine starke Energieumverteilungsreaktion: Da die Energie für Wärmeproduktion verloren

geht, steht diese nicht länger dem Immunsystem zur Verfügung und die Tiere sollten eine mildere Arthritis entwickeln.

Aufgrund wissenschaftlicher Hintergründe wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

1. Die Arthritisinduktion bewirkt eine starke und chronische Aktivierung des Immunsystems, daher sollte ein erhöhter Energieverbrauch vor allem in lymphatischen Organen - vielleicht aber auch in bisher nicht dem Krankheitsgeschehen zugeordneten Organen - sichtbar werden.
2. Arthritische Tiere, die vor der Immunisierung sympathektomiert werden, zeigen eine mildere Form der Krankheit, und es sollte daher ein verminderter Energieverbrauch in verschiedenen Organen sichtbar sein. Der gleiche Gedanke gilt bei arthritischen ATGL-defizienten Tieren.
3. Eine Icilin-Behandlung vor Immunisierung der Tiere führt zu einer verminderten Arthritis, da durch Kältezittern eine Energieumverteilungsreaktion ausgelöst wird, welche die Energie vom Immunsystem abzweigt.

In dem vorgelegten Versuchsvorhaben zielen wir auf die Beantwortung der Hypothesen ab. Dabei geht es uns insbesondere um folgenden Sachverhalt: Da die Aktivierung des Immunsystems energetisch betrachtet sehr kostspielig ist, steigt bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie Arthritis der Energiebedarf, um das aktivierte Immunsystem mit energiereichen Substraten zu versorgen. Es soll die potentielle Änderung des Energiebedarfs verschiedener Organe und im gesamten Tier im Verlauf der Arthritis unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Auf dem Boden dieser Erkenntnisse erwarten wir neue therapeutische Möglichkeiten, die sich möglicherweise durch eine gezielte Beeinflussung der Energieumverteilungsreaktion und der zellulären Bioenergetik erreichen lassen.

Im zweiten Teil der Arbeit lag der Fokus auf Untersuchungen zur Modulation der Zellmigration durch frühe Sympathektomie (aufbauend auf Ergebnissen des 1. Versuchsblocks der SEEC-Messungen). Es sollten neue Erkenntnisse hinsichtlich der Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf Lymphozyten (CD62L, CD11a, CCR7 und CCR21), des Einflusses des sympathischen Nervensystems auf den Egress von Lymphozyten via Sphingosin-1-Phosphat, sowie des Einflusses der Sympathektomie auf die Antikörperaffinitätsreifung im Lymphknoten gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Hersteller
2-Mercaptoethanol Lösung (50 µM)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Tabletten (TMB)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
6-OHDA (2,4,5-Trihydroxypenethylamin)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Agarose	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ciprofloxacin	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Erythrozyten-Lysepuffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FACSflow	BD Heidelberg, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
HEPES-Puffer (1 M)	PAN Aidenbach, Deutschland
Icilin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
inkomplettes Freund Adjuvant	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Iso-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ketamin	Zentrales Tierlaboratorium, Regensburg
Kollagen II vom Huhn	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kollagen Typ II (bovin, 2 mg/ml in 0,5 M Essigsäure)	Chondrex, Seattle, USA
komplettes Freund Adjuvant	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Mykobakterium tuberculosis H37 Ra	Difco Laboratories, Franklin Lakes, USA
NaCl-Lösung, steril (0.9 %)	Braun, Melsungen, Deutschland
PBS (Phosphate buffered saline)	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phosphat-Citrat-Puffer (CPP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Rotenon	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Merck, Darmstadt, Deutschland

Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid (30 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Xylazin	Zentrales Tierlaboratorium, Regensburg

2.1.2 Antikörper für FACS

Spezifität	Isotyp	Klon	Herkunft	Konjugat	Hersteller
CCL21	IgG2b	59106	Ratte	purified	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
CCR7	IgG2a	4B12	Ratte	PE	BD, Heidelberg, Deutschland
CD11a	IgG2a	2D7	Ratte	FITC	BD, Heidelberg, Deutschland
CD62L	IgG2a	MEL-14	Ratte	FITC	BD, Heidelberg, Deutschland
IgG (gegen Ratte)	Sek. AK	-	Ziege	FITC	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

2.1.3 Medien, Lösungen und Puffer

RPMI 1640 Medium (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland)

10 % FCS

1% Penicillin/Streptomycin (100 units/ml)

10 mM HEPES Puffer

0,57 mM Ascorbinsäure

1,75 μ M 2-Mercaptoethanol

(“komplettes RPMI-Medium”)

Dieses Medium wurde in den Sauerstoffverbrauchsmessungen für Milz, Lymphknoten, Thymus, Herz, Schilddrüse und das Fettgewebe um die Lymphknoten eingesetzt.

RPMI 1640 Medium (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland)

2 % FCS

1 % Penicillin/Streptomycin (100 units/ml)

10 mM HEPES Puffer

8 μ g/ml Ciprofloxacin

Dieses Medium wurde in den Sauerstoffverbrauchsmessungen für Rektum, Colon und Ileum eingesetzt.

DMEM Medium (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland)

10 % FCS

1% Penicillin/Streptomycin

Dieses Medium wurde in den Sauerstoffverbrauchsmessungen für Leber, Niere und Nebennieren eingesetzt.

F-12 + GlutaMax/IMDM 1:1 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

10 % FCS

1% Penicillin/Streptomycin (100 units/ml)

Dieses Medium wurde in den Sauerstoffverbrauchsmessungen für das Gehirn eingesetzt.

ELISA Substratpuffer

1 x 0.05 M Phosphat-Citrat Puffer Tablette, pH 5,0

Ad 10 ml aqua bidest

ELISA TMB Substratlösung

1 x TMB Tablette

9 ml Substratpuffer

2 µl 30 % H₂O₂

DEPC-Wasser

2 ml DEPC (Diethylpyrocarbonat) in 2 l aqua bidest

Autoklavieren

DEPC- PBS

5 PBS Tabletten in 1 l DEPC-Wasser

3,7 % Formaldehydlösung

100 ml 37 % Formaldehyd

Ad 1 l DEPC-PBS

50 x TAE Puffer

2 M Tris

1 M Essigsäure

100 mM EDTA

pH 8,3

2.1.4 Kits und Assays

Assay	Hersteller
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling	Sigma Aldrich, Steinheim, Germany
BD Cytofix/Cytoperm™ Kit	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
S1P competitive ELISA Kit	Echelon Biosciences via Mobitec, Göttingen, Deutschland
Mouse CCL21/6CKine DuoSet ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Mouse Anti-Type II Collagen IgG Assay Kit (bovine)	Cayman Chemical via Biomol Hamburg, Deutschland
Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, Frankfurt/Main, Deutschland
DNARelease	Finnzymes, Frankfurt/Main, Deutschland

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Biopsy Punch 2,3,4,5,6,8 mm	GlaxoSmithKline, München, Deutschland
C-Chip Einweg Haemozytometer	Digital Bio, Seoul, Korea
Einmal Insulinspritze, 1 ml	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Einmalpipetten	Corning, Corning, NY, USA
Einmalskalpelle Nr. 11	Feather, Japan
Einmalspritzen steril	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
ELISA-Platten (MaxiSorp™)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Hamiltonspritze 1 ml	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Kombitips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ohrmarken und Zange	Hauptner, Solingen, Deutschland
OxoDish® (24- well)	PreSens, Regensburg, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Petrischalen, 35x10 mm	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polystyrenröhrchen 5ml (FACS-Röhrchen)	Falcon, Heidelberg, Deutschland

Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterican ® Kanülen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm)	Millipore, Eschborn, Deutschland
Zellkulturplatten (6- und 24-well)	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Zellsieb, 70 µm	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	Falcon, Heidelberg, Deutschland

2.1.6 Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage Sartorius analytic A120S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Brutschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Durchflusszytometer Coulter EPICS X - MCL	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Durchlichtmikroskop	E. Leitz, Wetzlar, Deutschland
Elektrophoreseapparaturen	Biometra, Göttingen; Bio-Rad, München
ELISA Reader	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Haarschneider (Typ 1556)	Moser Elektrogeräte GmbH, Unterkirnach, Deutschland
Homogenisator IKA ® Ultra- Turrax	Medita, Hof, Deutschland
Laserimager Typhoon 8200	Amersham, Braunschweig
Megafuge 1.0R Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
Millipore Wasser-Filtrationsanlage	Millipore, Eschhorn, Deutschland
NanoDrop® 1000 UV/VIS Spektrometer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
pH-Meter	Wiss. Tech. Werkst., Weilheim, Deutschland
Pipetboy, 30-300 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetten 10; 100; 200; 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sensor Dish ® Reader (SDR)	PreSens GmbH, Regensburg, Deutschland
Sterilbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermocycler TRISTAR	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge E5415 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Waage Sartorius excellence E1200S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad (JULABO SW-20C)	JULABO Labortechnik, Sellbach, Deutschland

2.1.7 Tiere

Für alle Tierexperimente wurden ausschließlich männliche Mäuse im Alter von 8-10 Wochen verwendet. Sie wurden bei konstanten Temperaturverhältnissen von 21° C in einem 12-stündigen Tages- und Nachtrhythmus bei unbegrenztem Zugang zu Nahrung und Wasser in den zentralen Tierlaboratorien der Universität Regensburg in spezifiziert pathogenfreier (SPF-) Haltung untergebracht. Die Versuchstiere wurden zur Eingewöhnung mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn in den Versuchsraum gebracht und zu je 5 Tieren pro Käfig gehalten. Alle Tierexperimente wurden entsprechend der Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und gemäß der Richtlinien für tierexperimentelle Forschung von der Regierung der Oberpfalz genehmigt. (AZ 54-2531.1-24/06, AZ 54-2532.1-04/13). Die folgende Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme.

Mausstamm	Herkunft
DBA1/J	Janvier, Le Genest-St-Isle, Frankreich
C57BL/6	Charles River, Sulzbach, Deutschland
<i>Atgl</i> - KO	Eigene Zucht. Ursprung: Prof. Dr. Rudolf Zechner, Institut für Molekulare Biowissenschaften, Karl- Franzens- Universität Graz, Österreich

2.2 Methoden

2.2.1 Kollagen induzierte Arthritis

Die Kollagen induzierte Arthritis (Collagen induced arthritis, CIA) ist ein Mausmodell der rheumatoiden Arthritis (RA) und kann sowohl in DBA1/J Mäusen, als auch in C57BL/6 Mäusen ausgelöst werden. Dazu werden unterschiedliche Protokolle verwendet. Die CIA Modelle dienen der Aufklärung von Mechanismen, die zur Entwicklung und Aufrechterhaltung der Krankheit beitragen und helfen, neue Therapieansätze zu finden. Die Entwicklung des CIA Modells in C57BL/6 Mäusen ermöglicht die Verwendung von Knockout-Tieren in der Arthritis Forschung.

2.2.1.1 Arthritisinduktion bei DBA1/J Mäusen

Um die experimentelle Arthritis auslösen zu können, wurden zunächst gleiche Volumina von bovinem Kollagen Typ II (CII) mit komplettem Freund Adjuvant (CFA) mit Hilfe eines Homogenisators auf Eis emulgiert. Die Suspension wurde bis zur Verwendung

gekühlt aufbewahrt. Für die Immunisierung wurden die Mäuse in einer speziellen luftdurchlässigen Kammer fixiert. Jedem Tier wurden 100 µl der Suspension ca. 2 cm unter der Schwanzwurzel intradermal injiziert. Jede Maus erhielt somit 100 µg Kollagen Typ II. Die Arthritisinduktion, d.h. die Immunisierung erfolgte an Tag 0. Gesunden Kontrolltieren wurde anstelle der CII-FA Suspension eine sterile 0,9 % NaCl-Lösung intradermal injiziert.

2.2.1.2 Arthritisinduktion bei C57BL/6 Mäusen

Die Arthritisauslösung erfolgte in ähnlicher Weise wie bei den DBA1/J Mäusen, mit der Ausnahme, dass hier Hühner-Kollagen verwendet wurde, und eine zusätzliche Injektion der Immunisierungsemulsion unter die Rückenhaut durchgeführt wurde. Das Hühner-Kollagen wurde über Nacht in 0,1 M Essigsäure bei 4 °C gelöst (4 mg/ml). Das komplette Freund Adjuvant wurde frisch aus inkomplettem Freund Adjuvant (IFA) hergestellt. Dazu wurden 100 mg von Mycobacterium Tuberculosis in 30 ml IFA gelöst, um eine 3,3 mg/ml Lösung zu erhalten. Kollagen und CFA wurden wie oben beschrieben zu gleichen Volumina auf Eis homogenisiert. Vor der Immunisierung wurden die Tiere mit einem Cocktail aus Ketamin, Xylazin und NaCl durch intraperitoneale Gabe von 20-25 µl narkotisiert. Dies entspricht einer Dosierung von 6-8 mg /kg Xylazin und 90-120 mg/kg Ketamin. Sobald die Tiere eingeschlafen waren, wurden die Augen mit Augensalbe befeuchtet, um ein Austrocknen während der Narkose zu verhindern. Das Fell der Rückenhaut wurde über der Schwanzwurzel rasiert und jedem Tier insgesamt 100 µl der Immunisierungsemulsion (entspricht 200 µg Kollagen) injiziert. Dabei erfolgte ein Teil der Injektion intradermal in die Schwanzwurzel und ein Teil subkutan unter die Rückenhaut. Bis zum Erwachen aus der Narkose wurden die Tiere unter einer Wärmelampe positioniert. Kontrolltiere erhielten eine 0,9 % NaCl Injektion.

2.2.1.3 Klinischer Arthritis-Schweregrad

Für die Beurteilung des Arthritis-Schweregrades wurde ein Score-System benutzt. Dazu wurden die einzelnen Pfoten hinsichtlich der Rötung, Schwellung und Beeinträchtigung der Funktionstüchtigkeit untersucht. Es wurde beim Scoren eine Unterteilung in Finger/Zehen-Region, Mittelhand/Mittelfuß und Sprunggelenk vorgenommen. Bei der Finger/Zehen-Region wurde jeder Finger bzw. Zehe für sich bewertet. Für eine starke Schwellung und Rötung wurden 2 Punkte vergeben, mittlere Schwellung bedeutete 1 Punkt

und keine Schwellung 0 Punkte. Eine Abstufung mit 0,5 Scorepunkten war ebenfalls möglich. Weiterhin konnte 1 Extrapunkt pro Pfote vergeben werden, wenn diese stark in ihrer Funktion beeinträchtigt war und Hinken oder Vermeidungshaltung beim Klettern sichtbar war. Somit konnte für jede Extremität ein maximaler Score von 13 erreicht werden (4 x 2 Punkte für Finger/Zehen, 2 Punkte für Mittelhand/Mittelfuß, 2 Punkte für Sprunggelenk, 1 Punkt für sonstige Beeinträchtigung) und für das gesamte Tier 52 Scorepunkte. Die Tiere wurden in regelmäßigen Abständen hinsichtlich ihres Arthritis Scores geprüft.



Abb. 2.1.: Das Scoresystem zur Beurteilung des Arthritis-Schweregrades

Gezeigt sind von links nach rechts Hinterpfoten von DBA1/J Mäusen mit ansteigendem Score. Links sieht man eine gesunde Pfote (0 Punkte). Die in der Mitte abgebildete Pfote weist einen Score von 2 Punkten auf, da ein Zeh stark gerötet und geschwollen ist. Die rechts abgebildete Pfote ist mit einem Score von 10 Punkten arthritisch.

2.2.2 Depletion sympathischer Neuronen mittels 6-Hydroxydopamin (Sympathektomie)

In allen durchgeführten Versuchen wurde eine frühe Sympathektomie (SYX) durchgeführt. Diese wurde durch die intraperitoneale (i.p.) Injektion von 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) in 0,1 % Ascorbinsäurelösung in PBS erzielt. Die Tiere wurden an drei aufeinander folgenden Tagen (Tag -8, -7 und -6), also eine Woche vor der Immunisierung (Tag 0) behandelt. Zur Aufrechterhaltung der Sympathektomie erfolgte alle 14 Tage eine erneute Behandlung mit 80 mg/kg Körpergewicht.

2.2.3 Zucht und Genotypisierung von *Atgl*- Knockout Mäusen

Um die Auswirkungen der Ausschaltung des *Atgl*-Gens auf die Energiebereitstellung während der experimentellen Arthritis zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit

Atgl-Knockout (*Atgl*-KO) Tiere verwendet. Diese wurden freundlicherweise von Prof. Rudolf Zechner (Universität Graz) zur Verfügung gestellt. Bei der Zucht wurden zwei heterozygote Weibchen und ein Männchen im gebärfähigen Alter miteinander verpaart. Die Nachkommen wurden ab einem Alter von 14 bis 21 Tagen durch PCR Analyse der DNA aus Schwanzgewebe genotypisiert (2.2.3.2), im Alter von 4 Wochen abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt. Zur Überprüfung des jeweiligen Genotyps wurden alle Tiere mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) überprüft. Anhand der ermittelten Genotypen wurde dann festgelegt, welche Tiere miteinander verkreuzt werden können, um homozygote *Atgl*-Knockout (*Atgl*^{-/-}) Mäuse, heterozygote Tiere (*Atgl*^{+/-}) und Wildtypen für die Aufrechterhaltung der Zucht zu erhalten.

2.2.3.1 Präparation von genomischer DNA aus Mausgewebe

Zur Gewinnung genomischer DNA für die Genotypisierung wurde eine Schwanzspitzenbiopsie durchgeführt. Hierzu wurden 2-4 mm der Schwanzspitze von 14-21 Tage alten Jungtieren mit einem Skalpell abgetrennt, in Eppendorfgefäße überführt und auf Eis gelagert. Die DNA-Isolation wurde mithilfe des DNARElease der Firma Finnzymes durchgeführt. Dazu wurden pro Schwanzstück 19,5 µl TE Puffer pH 8,0 mit 0,5 µl DNARElease in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben, 15 Sekunden gevortext und anschließend 3 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach erfolgten zwei Inkubationsschritte in einem Wärmeblock (5 min bei 75 °C und 2 min bei 96 °C). Die Proben wurden nochmals bei 3 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, die im Überstand enthaltene DNA abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte mithilfe des Nanodrop ND-1000 der Firma PEQLAB. Vermessen wurden jeweils 1,2 µl der DNA-Proben. Das Verfahren beruht auf der Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm. Das Verhältnis der Nukleinsäureabsorption zur Proteinabsorption gibt Auskunft über den Reinheitsgehalt einer Nukleinsäurelösung. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt, basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste, bei 280 nm. Durch Bestimmung des Verhältnisses von OD 260 zu OD 280 kann man erkennen, inwiefern eine DNA-Lösung noch durch Alkohol und Proteinreste verunreinigt ist. Ein Verhältnis von 1,8 spricht für eine reine DNA-Isolierung. Durch Kontamination wird dieser Wert kleiner. Im Durchschnitt wurden DNA Konzentrationen von rund 200 ng/µl erreicht. Es wurde eine Arbeitslösung von 100 ng/µl hergestellt und die Proben bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein sehr empfindliches Nachweisverfahren, mit dem durch schrittweise Amplifikation geringe Mengen an DNA nachgewiesen werden können. Unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden (Primern), einer thermostabilen DNA-Polymerase, sowie den vier Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) können individuelle DNA-Fragmente in großer Menge synthetisiert und somit nachweisbar gemacht werden. Bei der Genotypisierungs-PCR wurden drei Primer verwendet, um eine spezifischen Wildtyp-Bande und eine Knockout-Bande detektieren zu können. Folgende Primer wurden für die PCR verwendet:

Primer	Sequenz (5'3')
ATGL-ko-fw	AGA GAG AGA AGC TGA AGC CTG G
ATGL-ko-rv	GCC AGC GAA TGA GAT GTT CC
ATGL-ko-Neo-rv	CTG CGT GCA ATC CAT CTT GT

Tabelle 2.1. Verwendete Primer für die Genotypisierungsreaktion

Die Primer wurden von der Firma MWG (Köln) synthetisiert. Es wurde eine 100 µM Stammlösung durch Lösen in Aquadest hergestellt und bei -20° C gelagert. Die Amplifikation erfolgte mit spezifischen Primern, dNTPs, sowie der Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase. Die Genotypisierungs-PCR wurde in einem 25 µl Maßstab angesetzt und in einem Thermocycler durchgeführt. Die PCR-Bedingungen der initialen Denaturierung, Denaturierung, Elongation und finalen Elongation wurden entsprechend der verwendeten Polymerase optimiert. Der Reaktionsansatz wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Reagenzien	Reaktionsansatz (25µl)
Phusion High- Fidelity DNA Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl
MgCl ₂ (2,5 mM)	1 µl
5 x Phusion HF Puffer	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	2,5 µl
ATGL-ko-fw Primer (10 µM)	2,5 µl
ATGL-ko-rv Primer (10 µM)	2,5 µl
ATGL-ko-Neo-rv Primer (10 µM)	2,5 µl
DMSO	1 µl
DNA	4 µl
Aquadest	ad 25 µl

Die Reaktionsansätze wurden auf Eis gekühlt und die PCR nach folgendem Protokoll ausgeführt:

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	1x	98 °C	3 min
Denaturierung	35x	98 °C	10 sec
Primer-Hybridisierung	35x	68 °C	30 sec
Elongation	35x	72 °C	30 sec
Finale Elongation	1x	72 °C	10 min

Tabelle 2.2 PCR- Protokoll für die Genotypisierung von ATGL-KO Mäusen

2.2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten nach erfolgter Amplifikation wurde eine Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Da Nukleinsäuren negativ geladen sind, wandern sie im elektrischen Feld. In einem Agarosegel können sie nach Masse aufgetrennt und durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid mit doppelsträngiger DNA im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in 2 %-igen Agarosegelen in Flachbettgelapparaturen mit 1x TAE-Puffer. Dazu wurden 2 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer gelöst und in einem Mikrowellenherd aufgeköcht. Die flüssige Agarose wurde mit 5 µl Ethidiumbromidlösung versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml) und in die Apparatur gefüllt. Geltaschen wurden durch den Einsatz eines Gelkammes vor Abkühlen des Gels produziert. Nachdem die

Agarose polymerisiert war, wurde das Gel in der Kammer mit TAE-Puffer vollständig überschichtet. Die zu analysierenden DNA-Proben wurde in entsprechendem Verhältnis mit 6x Gel-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Neben den DNA-Proben wurde als Referenzwert ein DNA-Größenmarker aufgetragen, der DNA-Fragmente definierter Größe im Abstand von 100 Basenpaaren (bp) anzeigt. Die Elektrophorese wurde für 45 min bei 80 V und 500 mA durchgeführt. Abschließend erfolgte eine Fotodokumentation auf einem UV-Schirm bei einer Wellenlänge von 254 nm. Die zu erwartenden Größen der PCR-Produkte lagen für homozygote KO Mäuse bei 620 bp, für heterozygote Mäuse bei 320 und 620 bp und für Wildtypmäuse (WT) bei 320 bp.

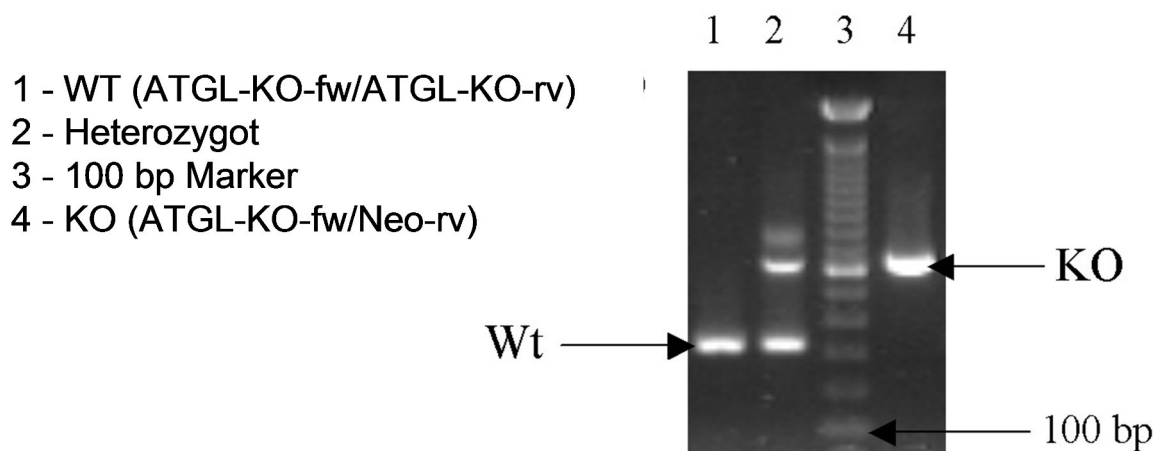


Abbildung 2.2: Erwartete Banden der Genotypisierung von Atgl-KO Mäusen

2.2.4 Auslösen von Kältezittern mittels Icilin

In diesem Versuch sollte der Einfluss einer Energieumverteilung auf die experimentelle Arthritis untersucht werden. Dazu wurde DBA1/J Mäusen jeweils morgens und abends Icilin i.p. injiziert. Icilin induziert durch Bindung an TRPM8 das Gefühl von Kälte, was zur Induktion von sogenannten „wet dog shakes“ (WDS) bei den Tieren führt. Die Behandlung erfolgte eine Woche lang, um den Immunisierungszeitpunkt von Tag -3 bis Tag +3. Icilin wurde jeden Tag frisch in 0,9 % NaCl-Lösung mit 1% DMSO gelöst. Die Dosis betrug 15 mg/kg Körpergewicht. Die Kontrolltiere erhielten nur das Vehikel (NaCl mit 1 % DMSO). Die Tiere wurden bis Tag 40 nach der Immunisierung beobachtet. Als Readout-Parameter dienten zum einen der Arthritis-Score, die Anzahl der wet dog shakes pro Minute, sowie die Körpertemperatur der Tiere über einen Zeitraum von 45 Minuten nach Icilin Gabe.

2.2.4.1 Implantation programmierbarer Temperaturtransponder

Zur Tieridentifikation wurde jedem Transponder vor der Implantation eine Nummer für das jeweilige Tier einprogrammiert. Jeder Maus wurden zwei Transponder eingesetzt: einer subkutan unter die Rückenhaut im Nacken und der Zweite in den Intra-peritonealraum. Zunächst wurden die Mäuse, wie unter 2.2.1.2 beschrieben, narkotisiert. Die Transponder wurden steril und einzeln verpackt geliefert und mit einer spritzenähnlichen Vorrichtung in die Tiere implantiert (siehe Abbildung 2.3). Das Auslesen der Identifikationsnummer und der Körpertemperatur erfolgte mit dem IPPT Smart Probe 7000 Scanner.



Abbildung 2.3: Implantation programmierbarer Temperaturtransponder unter die Rückenhaut

2.2.5 Organentnahme

Die Tiere wurden generell durch CO₂-Euthanasie getötet. Zur Organentnahme wurde das Fell mit Ethanol befeuchtet und die Organe aseptisch entnommen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Organe in PBS auf Eis gelagert. Restliches Bindegewebe wurde unter sterilen Bedingungen in Petrischalen entfernt.

2.2.6 Isolation muriner Primärzellen aus Milz und Lymphknoten

Die Zellisolation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Milz und Lymphknoten wurden mit einem 5 ml Spritzenstempel durch ein 70 µm Zellsieb gedrückt und in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Die Siebe wurden mit 10 ml komplettem RPMI-Medium gespült. Die Zellisolation der Lymphknotenzellen war nach diesem Schritt abgeschlossen. Bis zur Zellzählung wurden sie auf Eis gekühlt. Nach Zentrifugation bei 1600 rpm und 4 °C wurde das Milzzellpellet in 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer (NH₄Cl) resuspendiert und 10 min auf

Eis inkubiert. Danach wurden 9 ml RPMI-Medium dazugegeben und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden abschließend in 10 ml frischem Medium aufgenommen, durch ein Zellsieb filtriert und in Neubauer-Zählkammern ausgezählt.

2.2.7 Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Um die Zellzahl einer Zellsuspension zu bestimmen, wurden 10 µl Zellen mit 90 µl 0,15 % Trypanblau-Lösung gemischt und in die Zählkammer pipettiert. Ausgezählt wurde mit Hilfe eines Mikroskops bei 10-facher Vergrößerung. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Er dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Dadurch kann mit dieser Methode zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Die Zellzahl wurde abschließend mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \text{ (Kammerfaktor)}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadranten}} = \text{Zellzahl/ml}$$

2.2.8 *In vitro* Sauerstoffmessungen in Zell- und Gewebekultur

Die Sauerstoffmessungen wurden mit dem Sensor Dish ® Reader (SDR) der Firma PreSens GmbH (Regensburg) durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein Messsystem, das die Sauerstoffkonzentration in 24-well Kulturplatten (OxoDish ®) im Zellkulturmedium nicht-invasiv und kontinuierlich in einem Inkubator misst (Abbildung 2.4). Das System kann sowohl für Messungen mit Einzelzellkulturen, als auch Geweben eingesetzt werden.

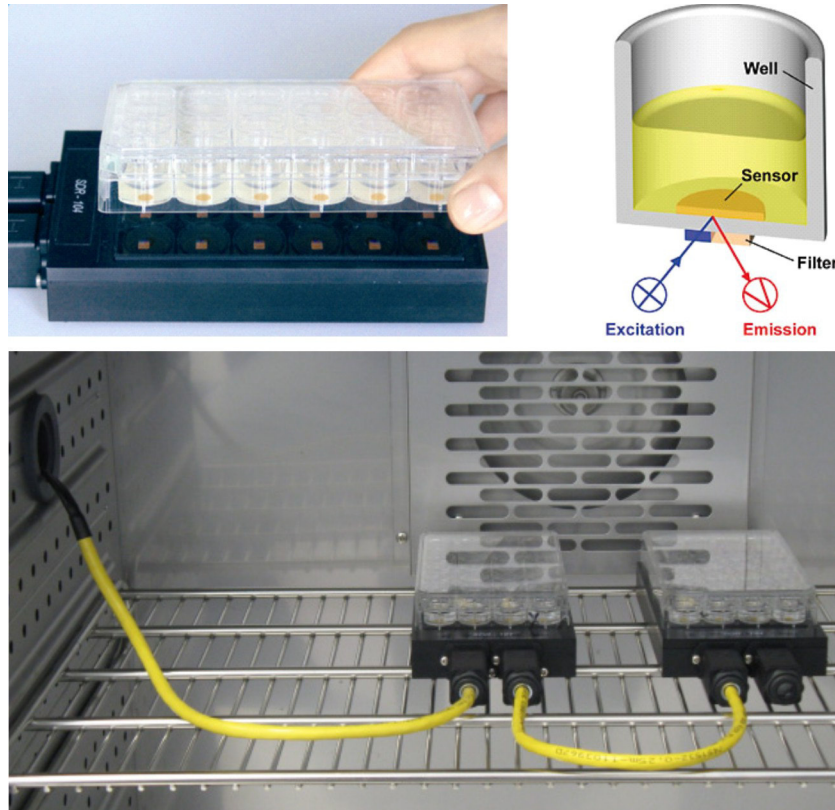


Abbildung 2.4: Das Messsystem des Sensor Dish ® Readers (SDR)

Die Messplatten (OxoDish ®) werden auf den SDR aufgesetzt und ein lumineszenter Farbstoff durch Lichteinstrahlung angeregt. Die Messung des Sauerstoffgehalts im Medium erfolgt bei 37 °C im Inkubator.

Auf dem Boden der Kavitäten der Zellkulturplatten ist ein Sensorpunkt angebracht, der einen lumineszenten Farbstoff enthält. Die Zellkulturplatten werden auf Messeinheiten, dem Sensor Dish ® Reader, aufgesetzt und der Farbstoff wird durch Licht, welches von dem SDR abgestrahlt wird, angeregt. Das Prinzip der Messung beruht auf dem dynamischen Lumineszenz-Quenching (Fluoreszenzlöschung) durch molekularen Sauerstoff (Abbildung 2.5). Beim Zusammenstoß mit Sauerstoff im Medium wird kein Lumineszenzsignal emittiert, und das Signal nimmt ab. Das heißt also, dass die Lebensdauer des Farbstoffes im Sensorpunkt abhängig vom O_2 -Partialdruck ist:

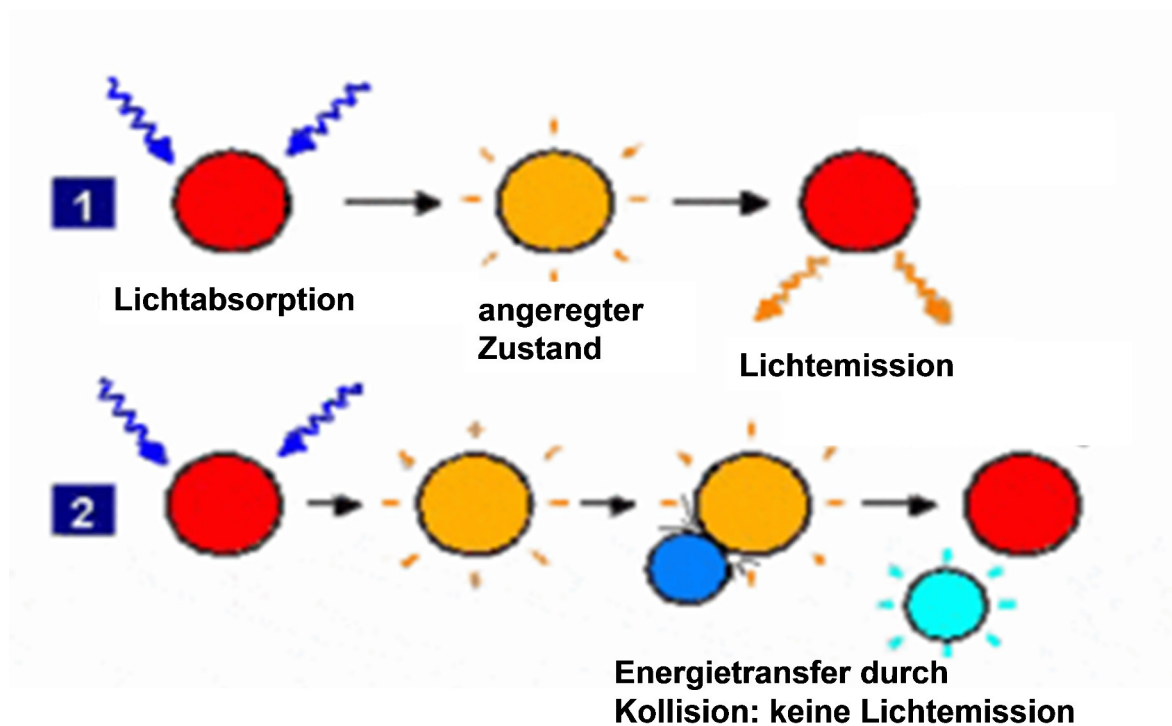


Abbildung 2.5: Prinzip des dynamischen Lumineszenz-Quenching durch molekularen Sauerstoff

(1) zeigt den Lumineszenzvorgang bei Abwesenheit von Sauerstoff, Abschnitt (2) die Deaktivierung des lumineszenten Indikatormoleküls durch molekularen Sauerstoff. Die Kollision zwischen Luminophor in dessen angeregten Zustand und dem Quencher (Sauerstoff) resultiert in einer strahlungslosen Deaktivierung und wird als dynamisches Quenchen bezeichnet. Nach der Kollision findet ein Energietransfer von dem angeregten Indikatormolekül auf Sauerstoff statt, welcher dadurch von seinem Grundzustand (Triplet) zum angeregten Singulettzustand transferiert wird. Somit wird dann keine Lumineszenz emittiert und das messbare Signal nimmt ab.

Vor jeder Messung werden für jede OxoDish[®] Platte die erforderlichen Kalibrierungsparameter auf dem angeschlossenen Computer hochgeladen. Man legt ein Messintervall fest und kann dann die Messung starten. Die Daten werden mit der Software in Sauerstoffkonzentrationen im Medium umgerechnet. Mit dem SDR-System sollte eine Hochdurchsatz-Methode entwickelt werden, die eine parallele Untersuchung des Sauerstoffverbrauchs in unterschiedlichen Organen aus verschiedenen Tierexperimenten ermöglicht. Auf diese Weise sollte eine Energieverbrauchskarte erstellt werden, die Organe mit hohem Energieumsatz im Krankheitsverlauf der experimentellen Arthritis identifiziert (SEEC; *spatial energy expenditure configuration*). Folgende Organe sollten untersucht werden: Milz, drainierende Lymphknoten, Thymus, Herz, Leber, Nieren, Nebennieren, umliegendes Fettgewebe der Lymphknoten, Darm (Rektum, Colon, Ileum), Schilddrüse und Gehirn.

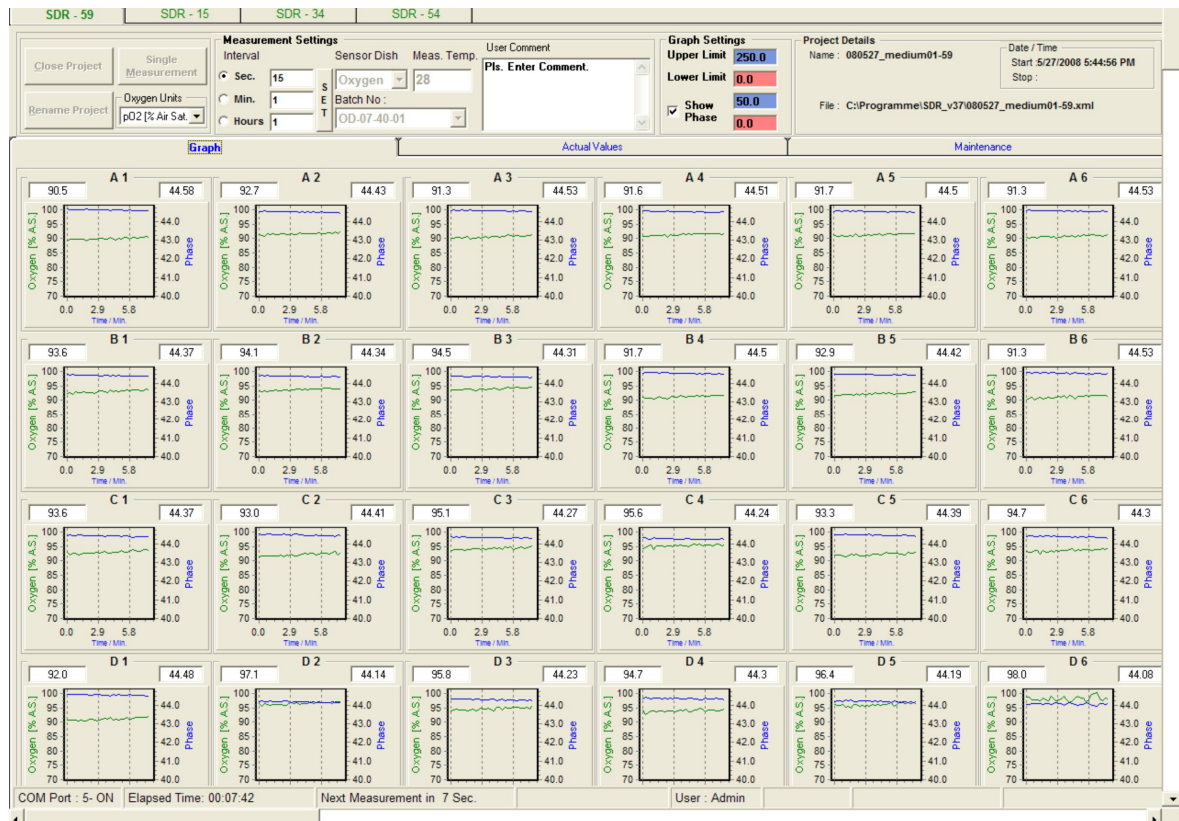


Abbildung 2.6: Benutzeroberfläche des Sensor Dish ® Reader

Es können bis zu zehn SDRs mit der benutzerfreundlichen Oberfläche kontrolliert werden. In diesem Beispiel sind es vier Messplatten, die an einzelnen Reitern (oben links) betrachtet werden können. Die Sauerstoffkinetiken werden über die komplette Kultivierungsdauer der Proben in jedem well visualisiert. Es besteht die Möglichkeit zwischen der Anzeige des Graphen oder den derzeitigen Sauerstoffwerten („graph“ oder „actual value“) zu wählen. Weiterhin kann die Einheit der Sauerstoffkonzentration und das Messintervall festgelegt werden. Die Kalibrierungsparameter sind durch die Batch-Nummer der jeweiligen OxoDish ® Platte vorgegeben. Nach Beendigung der Messung werden die gemessenen Daten in Excel exportiert und ausgewertet.

2.2.8.1 Sauerstoffmessungen in Zellkultur

Zunächst wurden die Messungen mit gesunden Milzzellen von DBA1/J Mäusen durchgeführt, um die notwendige Zellzahl pro well zu bestimmen. Die Zellen wurden wie unter Punkt 2.2.6 beschrieben, isoliert. Mit einer Zellzahl von 500.000, 1 Mio., 2 Mio., 2,5 Mio., 5 Mio., und 7,5 Mio. wurden erste Messungen durchgeführt. Als Referenz diente RPMI-Medium ohne Zellen. Pro Vertiefung wurde 1 ml Medium verwendet. Weiterhin sollte durch Zugabe einer Negativkontrolle der Sauerstoffverbrauch gehemmt werden, um so die Verlässlichkeit der Messmethode zu untermauern. Die Blockade des Sauerstoffverbrauchs wurde mit Rotenon bei einer Konzentration von 1 μ M erreicht. Rotenon blockiert den ersten Komplex der Atmungskette in der Mitochondrienmembran. Diese Versuche zeigten, dass mindesten 5 Millionen Milz- oder Lymphknotenzellen pro Vertiefung eingesetzt werden mussten, um Unterschiede im Sauerstoffverbrauch

verglichen mit dem reinen Medium zu erhalten. Erste Vorversuche haben gezeigt, dass arthritische Milzzellen einen höheren Sauerstoffverbrauch aufweisen als Milzzellen aus gesunden Kontrolltieren. Im Verlauf der Vorversuche stellte sich jedoch heraus, dass nicht aus allen Organen, die untersucht werden sollten, genügend Zellen isolierbar waren. Aus diesem Grund wurden im nächsten Entwicklungsschritt der SEEC-Methode Organstücke einer definierten Größe für die Sauerstoffmessungen evaluiert.

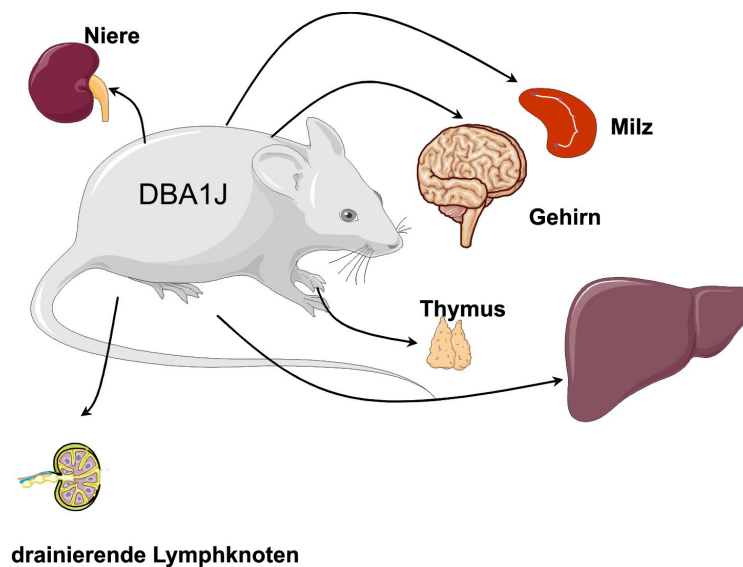
2.2.8.2 Sauerstoffmessungen in Gewebekultur

Die einzelnen Organe wurden entnommen und in PBS auf Eis gelagert. Anschließend wurden unter sterilen Bedingungen mit Hautbiopsiestanzen Organstücke definierter Größe ausgeschnitten. Lymphknoten und Nebennieren wurden im ganzen Stück in die Vertiefungen der OxoDish® Platten gegeben. Es wurden Organstücke mit einem Durchmesser von 2 mm, 3 mm, 4 mm, 5 mm und 6 mm ausgeschnitten und der Sauerstoffverbrauch gemessen. Es konnte eine klare Korrelation zwischen O₂-Verbrauch und Organstückgröße festgestellt werden (siehe Abbildung 3.3). Für alle folgenden Experimente wurden Organstücke mit einer 4 mm Biopsiestanze ausgeschnitten. Die 24-well OxoDish® Platten wurden bis zum Beginn der Messung bei 4 °C gelagert. Vor dem Einsatz auf den SDR wurden die Platten leicht geschüttelt, sodass sich alle Organstücke am unteren Rand in den Kavitäten befanden. Das Messintervall wurde auf 3 Minuten festgelegt und jede Messung dauerte 6 Stunden. Nach drei Stunden war die Temperatur im Medium bei rund 36,7 °C konstant. Ab diesem Zeitpunkt zeigten auch die Sauerstoffverbrauchskurven konstante Werte, was eine Bestimmung des O₂-Verbrauchs in µmol/l/h ermöglichte. Dazu wurden die Daten in Excel exportiert, die Mittelwerte des Sauerstoffverbrauchs zwischen Stunde 3 und Stunde 4 gebildet und davon der Medium-Blank-Wert abgezogen. Dieser Wert wurde für jedes Organstück bestimmt. Pro Organ wurden zwei 4 mm große Stücke auf der Platte gemessen.

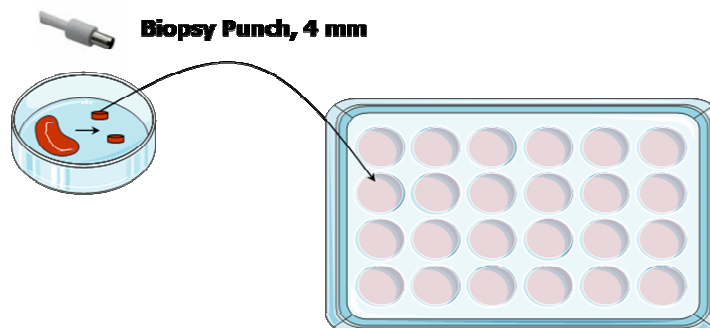
2.2.8.3 Standardisierung der “*Spatial Energy Expenditure Configuration* (SEEC)“-Methode

Um gleiche Bedingungen zu gewährleisten, musste eine passende Standardisierung der Sauerstoffmessung in Organstücken erfolgen. Der erste Parameter, der festgelegt wurde, war der Stanzdurchmesser von 4 mm, um die Organstücke auszuschneiden. Dennoch waren damit aufgrund der anatomischen Gegebenheiten nicht alle unterschiedlichen

Organstücke gleich groß, und es mussten weitere Zielgrößen bestimmt werden. Als Zielgröße 1 diente das Gesamtorgangewicht. Das Gewicht des Organstückchens wurde als Zielgröße 2 festgelegt. Das Körpergewicht der entsprechenden Maus stellte die Zielgröße 3 dar. Der Sauerstoffverbrauch konnte somit auf das Organgewicht und Körpergewicht der Maus normalisiert werden. Die Angabe des Sauerstoffverbrauchs wird als Verbrauch in $\mu\text{mol/l/h/mg}$ Organ angeben, um Vergleiche zwischen einzelnen Organen ziehen zu können. Die endgültige Angabe des Sauerstoffverbrauchs erfolgt als Sauerstoffverbrauch des gesamten Organs in $\mu\text{mol/l/h}$ und ist dabei auf das Tiergewicht normalisiert. In der folgenden Abbildung ist die SEEC-Methode schematisch dargestellt.



Im ersten Schritt werden die Organe entnommen und abgewogen. Weiterhin wird das Mausgewicht bestimmt.



Anschließend werden Organstücke mit einem 4 mm Durchmesser ausgestanzt und in die Vertiefungen der OxoDish® Platten gefüllt. Pro well wird 1 ml Medium verwendet. Bis zum Beginn der Messung werden die Platten bei 4 °C aufbewahrt.

Zur endgültigen Standardisierung werden folgende Zielgrößen (ZG) verwendet:

ZG 1: O_2 im Organstück = Sauerstoffverbrauch/ mg Organ

ZG 2: O_2 im Gesamtorgan = Sauerstoffverbrauch x ZG 1

ZG 3: O_2 im Gesamtorgan im Tier = ZG 2 / Körpergewicht

Der Sauerstoffverbrauch der einzelnen Organe wurde als ZG 3 in $\mu\text{mol/l/h}$ angegeben.

2.2.9 PKH26-Markierung isolierter Lymphknoten- und Milzzellen

Die Zellen wurden wie unter Punkt 2.2.6 beschrieben isoliert und ausgezählt. Für die *ex vivo* Färbung von Milz- und Lymphknotenzellen wurde der PKH26 Kit der Firma Sigma verwendet. Dabei handelt es sich um einen fluoreszenten, lipophilen Farbstoff, der sich stabil in die Lipidregionen von Zellmembranen verankert. Gefärbte Zellen können mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Alle Färbeschritte wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Zunächst wurden 30 Millionen Zellen in frische 50 ml Falcon Röhrchen überführt und mit sterilem PBS gewaschen (1200 rpm, 5min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Diluent C resuspendiert. Danach wurden 3 μl der Färbelösung dazugegeben und bei leichtem Schütteln drei Minuten inkubiert. Das Stoppen der Färbereaktion erfolgte durch Zugabe von 10 ml komplettem RPMI-Medium. Nach einem Zentrifugationsschritt (1200 rpm, 10 min) wurden die Zellen durch ein 70 μm Zellsieb in ein frisches Falcon Röhrchen überführt. Nach zwei weiteren Waschschritten wurde die Viabilität und Zellzahl mittels Trypanblau Exklusionstest geprüft. Abschließend wurden 25 Millionen Zellen in 200 μl sterilem PBS aufgenommen und auf Eis gelagert. Für spätere FACS-Analysen der Farbeintensität wurde eine Stichprobe in 2 % PFA- Lösung fixiert und bei 4 °C gelagert.

2.2.10 Intravenöse Zellinjektion

Um das Migrationsverhalten der gefärbten Zellen überprüfen zu können, wurden diese in gesunde Mäuse und sympathektomierte Tiere reinjiziert. Die Zellen wurden wie oben beschrieben isoliert, gefärbt und 25 Millionen in die Schwanzvene gespritzt. Dazu wurden

die Mäuse in einer Kammer fixiert, sodass der Schwanz frei zugänglich war. Der Schwanz wurde einige Minuten in warmes Wasser gehalten, um die Durchblutung der Schwanzvene zu verstärken. Die Zellen wurden in einem Volumen von 200 µl PBS appliziert. 24 Stunden nach der Injektion wurden Milz und Lymphknoten entnommen, die Zellen isoliert und per FACS-Analyse vermessen.

2.2.11 Durchflusszytometrische Messungen

Mittels Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescent activated cell sorting*) lassen sich verschiedene Zellparameter bestimmen. So können neben Zellgröße und Granularität auch Oberflächenmoleküle durch Anfärben mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachgewiesen werden. Die markierten Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom vereinzelt und durch die laminare Strömung der Messflüssigkeit in einen Laserstrahl geleitet. Die Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch das Licht des Laserstrahls hat eine kurzfristige Anhebung dieser auf ein höheres Energieniveau zur Folge. Fallen die Elektronen zurück, so kommt es zur Emission von Photonen, die vom Gerät je nach Farbe und Intensität getrennt registriert werden. Dabei verhält sich die emittierte Photonenintensität proportional zur Menge an gebundenem Antikörper pro Zelle. Durch die im Probenstrom enthaltenen Bestandteile wird das Licht beim Auftreffen der Strahlen in der Messküvette gestreut, sodass selbst unmarkierte Zellen Ergebnisse liefern: Die nach vorn abgelenkten Strahlen sind ein Maß für die Größe der gemessenen Zellen (Vorwärtsstreulicht, Forwardscatter – FSC). Das in einem 90°-Winkel abgestrahlte Seitwärtsstreulicht wird als Sidescatter (SSC) bezeichnet und dient als Maß für die Zellgranularität. Auf diese Weise ist es möglich, die in einer Probe enthaltenen Zellen nach Größe und Granularität, sowie auf Fluoreszenzintensität, also auf das Vorhandensein verschiedener Moleküle gleichzeitig zu untersuchen. Mehrfachbestimmungen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen sind möglich, da sich trotz identischer Anregungswellenlänge die Emissionsspektren der jeweiligen Farbstoffe unterscheiden. Als Fluorochrome wurden in dieser Arbeit FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) und PE (Phycoerythrin) verwendet. Die Wellenlängenbereiche sind in Tabelle 2.3 dargestellt. Die Messungen wurden am Durchflusszytomer Coulter EPICS-XML durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Analyseprogramm FlowJo (Treestar Inc., Ashland Oregon, USA).

Fluorochrom	Laser Anregung (nm)	Absorptionsmaxima (nm)	Emissionsmaxima (nm)
FITC	488	490	525
PE	488	490; 565	578

Tab. 2.3: Absorptions- und Emissionswellenlängen verwendeter Fluorochrome

2.2.11.1 Oberflächenfärbungen

Für jeden Färbeansatz wurden 1×10^6 Zellen verwendet. Dazu wurden die Zellen in Eppendorfgefäßen in 1 ml sterilem PBS aufgenommen und 10 µl des Antikörpers zugefügt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C im Dunkeln wurden die Zellen in frischem PBS gewaschen (1200 rpm, 5 min, 4 °C) und das Zellpellet für die anschließende FACS-Messung in 500 µl frischem PBS resuspendiert. Die ideale Konzentration der Färbeantikörper wurde in Vorversuchen durch Titration bestimmt. Konnte die FACS-Analyse nicht sofort erfolgen, so wurden die gefärbten Zellen mit 2 % Paraformaldehydlösung fixiert und bis zur Messung maximal 3 Tage bei 4° C gelagert.

2.2.11.2 Färbung intrazellulärer Moleküle

Die Färbung von CCL21 erfolgte intrazellulär. Um die Zellmembranen zu permeabilisieren, wurden die Zellen in 1ml Fixierungs/Permeabilisierungslösung (eBioscience) für 20 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit 1 ml Permeabilisierungspuffer gewaschen und für 30 min bei 4 °C mit anti-CCL21 Antikörper, bzw. mit der entsprechenden Isotypkontrolle ($1 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ Zellen) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Permeabilisierungspuffer erfolgte die Färbung mit dem FITC-gekoppelten Sekundarantikörper für 30 min bei 4°C im Dunkeln. Abschließend wurden die Zellen mit Permeabilisierungspuffer gewaschen und in frischem Puffer aufgenommen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 1200 rpm (4°C, 5 min).

2.2.12 ELISA

Der ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) ist einer der am häufigsten angewendeten quantitativen Immunoassays. Es handelt sich dabei um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, bei dem durch eine enzymatische Farbreaktion Proteine in einer Probe, wie z.B. Blutserum, nachgewiesen werden. Die Bindung spezifischer enzymmarkierter Antikörper an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) wird

durch Zugabe eines Substrats visualisiert. Der Farbumschlag des Reaktionsproduktes wird photometrisch gemessen, wobei die Farbintensität Aufschluss über die Menge des gebundenen Antigens im Vergleich zu einer Standardreihe gibt.

2.2.12.1 Blutentnahme zur Serumgewinnung

Die Blutentnahme erfolgte an Tag 18 nach der Immunisierung durch Herzpunktion am frisch getöteten Tier. Das Blut wurde in Eppendorfröhrchen ohne Gerinnungshemmer überführt und mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Anschließend wurde das Serum vom Blutkuchen abzentrifugiert (10 min, 13000 rpm), in frische Eppendorfgefäße pipettiert und bei -20°C gelagert.

2.2.12.2 Kompetitiver ELISA zur Bestimmung von Sphingosin-1-Phosphat

Der ELISA wurde mit dem verwendungsbereiten Sphingosine-1-Phosphate Assay Kit der Firma Echelon Biosciences durchgeführt. Bei diesem kompetitiven Assay bedeutet eine niedrige OD eine höhere S1P Konzentration. Zunächst wurden dabei S1P Standards und die Proben mit einem anti-S1P Antikörper gemischt und inkubiert. Danach erfolgte die Übertragung auf eine S1P beschichtete ELISA Platte. Ungebundene Komponenten wurden durch Waschen entfernt, ein Streptavidin-HRP Konjugat zugefügt und inkubiert. Abschließend wurde das HRP Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) dazugegeben und die Absorption bei 450 nm gemessen. Dabei bedeutete ein höheres Signal niedrigere S1P Konzentrationen und niedrige OD höhere S1P Konzentrationen in den Serumproben.

Vor der Durchführung wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht. Alle weiteren Schritte wurden ebenfalls bei RT durchgeführt. Die vorbeschichtete Platte wurde zunächst mit 150 µl/well einer Blocklösung behandelt und eine Stunde inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Standardreihe von S1P hergestellt. Dafür wurde der im Kit enthaltene S1P Standard im lipidfreien Humanserum zu folgenden Konzentrationen verdünnt: 2 µM, 1 µM, 0,5 µM, 0,25 µM, 0,13 µM, 0,06µM und 0 µM als Blank. Die Serumproben wurden 1:1000 verdünnt und anschließend mit dem anti-S1P Antikörper in einer separaten Platte kombiniert. Nach viermaligem Waschen der ELISA Platte mit PBS wurden 100 µl der kombinierten Standards und Proben in Doppelbestimmung auf die Platte aufgetragen und für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Platte erneut vier Mal mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 100 µl Streptavidin-HRP in jedes well. Die Inkubation dauerte ebenfalls eine Stunde. Bevor 100 µl des TMB

Substrats aufgetragen wurde, erfolgte ein erneuter Waschschrift, um ungebundene Komponenten zu entfernen. Die Inkubation von TMB wurde 30 Minuten im Dunkeln durchgeführt. Abschließend wurde die Reaktion mit 2 M Schwefelsäure (H₂SO₄) gestoppt und die Absorption der Platte bei 450 nm im ELISA Reader gemessen. Die Daten wurden mit der Microplate Manager 6 Software (MPM6, Bio-Rad, München, Deutschland) ausgewertet.

2.2.12.3 Sandwich ELISA zur Bestimmung von anti-Kollagen Typ II Antikörpern

Dieser ELISA wurde mit dem verwendungsbereiten Mouse Anti- Type II Collagen IgG Assay Kit (bovine) der Firma Cayman Chemical Company durchgeführt. Die 96-well Platten waren bereits mit bovinem Kollagen Typ II beschichtet. Autoantikörper aus dem Mausserum, die gegen Kollagen Typ II gerichtet sind, binden an das immobilisierte Kollagen II auf der ELISA Platte. Es folgt die Zugabe eines Detektionsantikörpers, welcher murine Immunglobuline bindet. Dieser Detektionsantikörper ist mit dem Enzym HRP (*horseradish peroxidase*) gekoppelt und ermöglicht die Quantifizierung der Autoantikörper in den Serumproben. Nachfolgend wird das HRP Substrat TMB auf die Platte gegeben, welches durch Zugabe einer Stopplösung ein gelb gefärbtes Produkt ergibt. Die Farbintensität wird photometrisch gemessen und ist direkt proportional zu der Menge an gebundenem anti-Maus IgG/HRP, d.h., der Konzentration von Kollagen Typ II Autoantikörpern in den Serumproben.

Für die Durchführung des ELISA wurde zunächst eine Standardreihe von murinem anti-Typ II Kollagen IgG (polyklonal) angefertigt. Die Ausgangskonzentration betrug 1000 ng/ml. Mittels serieller 1:2 Verdünnung wurden 6 weitere Standardkonzentrationen vorbereitet (500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62,5 ng/ml, 31,3 ng/ml und 15,6 ng/ml), wobei eine weitere Probe der Standardreihe keinen Antikörper enthielt und als Blank-Wert diente, also als Indikator für unspezifische Bindung. Die Seren wurden 1:1000 vorverdünnt. Anschließend wurden 100 µl der Standards und der Serumproben pro Vertiefung in Doppelbestimmung auf die Platte aufgetragen. Für alle Verdünnungsschritte wurde der im Kit enthaltene EIA-Puffer verwendet. Die Platte wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte der Nachweis der gebundenen anti- Kollagen Typ II Antikörper durch Einsatz des HRP-gekoppelten anti-Maus IgG (100 µl/well). Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden (RT). Nach erneutem Waschen wurde als Substrat für die HRP pro Vertiefung 100 µl einer TMB- Lösung zugefügt und 15 Minuten bei Raumtemperatur

inkubiert. Abschließend wurde der Substratumsatz mit 50 µl/well einer 2 M H₂SO₄ Lösung gestoppt und die OD bei 450 nm im ELISA Reader gemessen. Zur Auswertung der Daten wurde das Programm MPM6 verwendet.

2.2.12.4 Elutionsmethode zur Antikörper-Aviditätsbestimmung mit NaSCN

Natriumthiocyanat (NaSCN) ist ein chaotropes Salz, das die geordneten Wasserstoffbrückenbindungen stört und die Bindung zwischen Proteinen auflöst. Man spricht auch von strukturbrechenden Salzen. Bei einer Elution mit steigenden Konzentrationen von NaSCN wird der Antigen-Antikörper Komplex zerstört, und man kann auf diese Weise Aufschluss über die Bindungsstärke zwischen Antigen und Antikörper erhalten. Diese Methode wurde mehrfach in der Literatur beschrieben (119-121).

Der ELISA wurde wie unter Punkt 2.2.12.3 beschrieben durchgeführt. Aus einer 8 M NaSCN Stammlösung wurde eine Konzentrationsreihe in PBS erstellt, um die Bindungsstärke zwischen dem Kollagen Typ II auf der ELISA Platte und den aCII Antikörpern aus dem Mausserum bewerten zu können. Folgende Konzentration von NaSCN wurden getestet: 0,125 M, 0,25 M, 0,5 M, 0,75 M, 1 M und 1,25 M. Die Serumproben wurden initial 1:1000 verdünnt und jede Probe in 14 Vertiefungen auf die ELISA Platte aufgetragen, sodass eine Zugabe von steigender NaSCN Konzentration in Doppelbestimmung erfolgen konnte. Nach der Inkubation der Standards und der Proben von zwei Stunden erfolgte wie zuvor beschrieben viermaliges Waschen mit Waschpuffer. Zu den Standards und je zwei Vertiefungen der einzelnen Proben wurden 100 µl PBS zugegeben, um somit einen Referenzwert der Antikörperkonzentration ohne NaSCN Behandlung zu erhalten. Die steigenden Konzentrationen von 0,125 M bis 1,25 M NaSCN wurden für jede Serumprobe in Doppelbestimmung getestet (100 µl/well). Nach 15 minütiger Inkubation auf dem Orbitalschüttler erfolgte ein erneuter Waschschrift und der Nachweis der gebundenen anti-Kollagen Typ II Antikörper durch Einsatz des HRP-gekoppelten anti-Maus IgG (100 µl/well). Der ELISA wurde wie unter Punkt 2.2.12.3 abgeschlossen. Aus den erhaltenen Antikörperkonzentrationen wurde das Maß der Bindungsstärke ermittelt. Dazu wurde die Konzentration ohne NaSCN Behandlung als 100 % gesetzt und die dementsprechende Abnahme der Antikörper durch die NaSCN Behandlung berechnet.

2.2.12.5 Sandwich ELISA zur Bestimmung von murinem CCL21

Als Probenmaterial dienten Zellkulturüberstände von Milz und Lymphknotenzellen. Diese wurden zuvor 24 h im Brutschrank bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Von jedem Tier wurden zwei Ansätze mit je 5 Millionen Zellen pro Vertiefung einer Zellkulturplatte angesetzt. Die Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Für diesen ELISA wurde das Duo Set System der Firma R & D Systems verwendet. Zunächst wurde eine 96-well Platte mit dem Ratte anti-Maus CCL21 Fänger Antikörper (4 µg/ml in PBS, 100 µl/well) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle weiteren Schritte ebenfalls bei Raumtemperatur. Die beschichtete Platte wurde vier Mal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 1 % Rinderserumalbumin (BSA)-Lösung in PBS geblockt und eine Stunde lang inkubiert. Ausgehend vom im Kit enthaltenen rekombinanten murinen CCL21 wurde durch zweifache serielle Verdünnung in PBS mit 1 % BSA in der Zwischenzeit eine 7-Punkt-Standardreihe erstellt. Die höchste Konzentration betrug dabei 1000 pg/ml CCL21, die niedrigste 15,625 pg/ml. Die ELISA Platte wurde vier Mal mit PBS gewaschen, die Standards und Proben mit 100 µl/well in Doppelbestimmung aufgetragen und danach 2 Stunden inkubiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBS. Im nächsten Schritt wurden 9 µg/ml des biotinylierten Ziege anti-Maus CCL21 Detektionsantikörpers auf die Platte aufgetragen (100 µl/well) und erneut für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS wurden pro well 100 µl der Streptavidin-HRP Lösung dazugegeben und für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Platte wurde dann wieder gewaschen und 100 µl der TMB enthaltenden Substratlösung in jedes well pipettiert. Nach 20 Minuten im Dunkeln wurde abschließend eine 2 M Schwefelsäure als Stopplösung dazugegeben und die Platte bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 570 nm im ELISA Reader gemessen. Die Daten wurden mit der MPM6 Software ausgewertet.

2.2.13 Statistik

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Box-Plots mit Median und der 10.-, 25.-, 75.- und 90.- Perzentilen, sowie als Median mit 25. und 75. Perzentile in den Tierexperimenten. Zum Vergleich von zwei Gruppen wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test (MWU-Test) verwendet. Um den Arthritis-Schweregrad zwischen verschiedenen Gruppen während der Beobachtungsperiode zu vergleichen, wurde die Methode des *general linear model* angewendet (GLM). Für die statistische Analyse wurde das Programm SigmaPlot

(V.11.0, Systat Software, Inc., Erkrath, Deutschland) verwendet. Unterschiede ab $p < 0.05$ wurden als signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Sauerstoffverbrauchsmessungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Hochdurchsatz-Methode zur Messung des Sauerstoffverbrauchs als Maß des Energieverbrauchs in einzelnen Organen im Verlauf der experimentellen Arthritis etabliert. Dazu wurde der Sensor Dish[®] Reader (SDR) verwendet. Dieser erlaubt eine kontinuierliche und nicht-invasive Messung des Sauerstoffgehalts in 24- well Platten in Zell- bzw. Gewebekultur. Zunächst wurde der Sauerstoffverbrauch in Milzzellkultur getestet, um die nötige Zellzahl für detektierbare Signale zu bestimmen (Abb. 3.1).

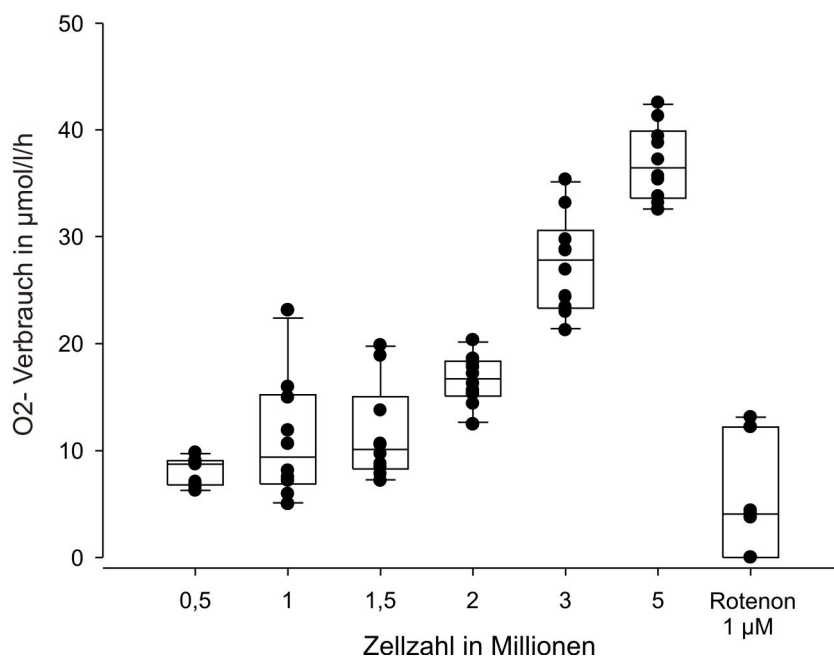


Abbildung 3.1: Sauerstoffverbrauch in gesunden Milzzellen in Abhängigkeit von der Zellzahl
Mit steigender Zellzahl erhöht sich der Sauerstoffverbrauch in gesunden Milzzellen. Das stärkste Signal von rund 40 µmol/l/h wurde bei einer Zellzahl von 5 Millionen pro well erhalten. Der Sauerstoffverbrauch konnte durch Rotenon bis auf ein Minimum blockiert werden. Jede Bedingung wurde 10 Mal untersucht. Gezeigt sind Box Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile.

Im nächsten Schritt wurde explorativ der Sauerstoffverbrauch von 5 Millionen gesunden und kranken Milzzellen aus DBA1/J Mäusen untersucht. Die folgende Abbildung zeigt, dass nach einer Zeitspanne von 3 Stunden die Temperatur im Zellkulturmedium konstant bei ca. 36,7 °C ist und somit auch die Sauerstoffkonzentration keinen weiteren Schwankungen durch Temperaturänderung unterliegt.

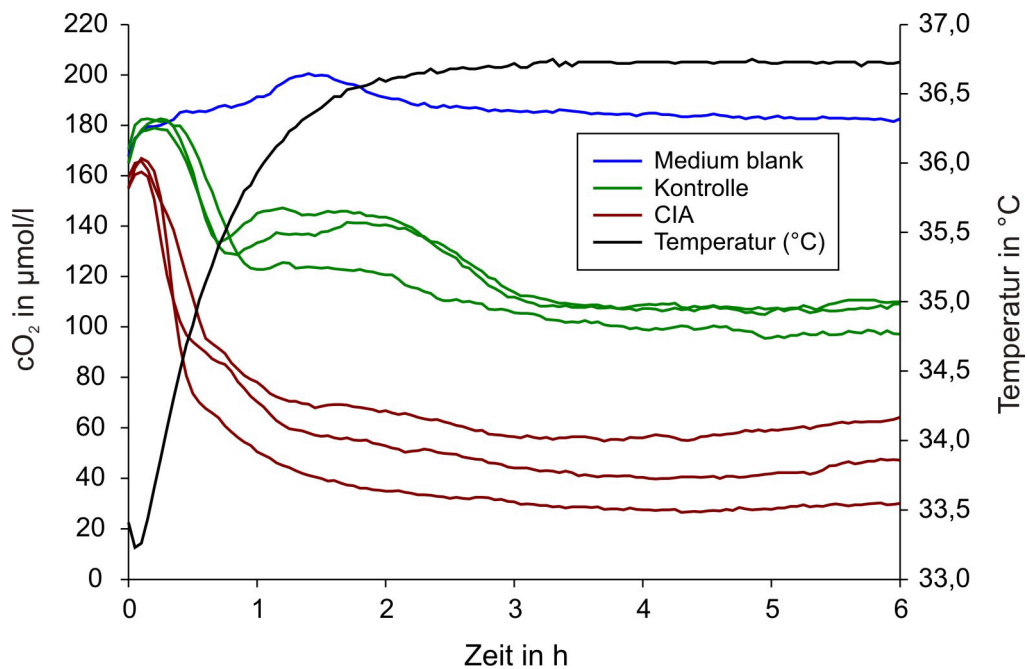


Abbildung 3.2: O_2 -Verbrauch in gesunden Milzzellen verglichen mit arthritischen Milzzellen
Fünf Millionen Milzzellen aus gesunden (Kontrolle, grün) und arthritischen (rot) DBA1/J Mäusen wurden 6 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Nach drei Stunden war die Temperatur im Medium konstant (schwarze Linie). Im Medium ohne Zellen (Medium blank, blaue Linie) findet kein Sauerstoffverbrauch statt. Arthritische Milzzellen verbrauchen mehr Sauerstoff als gesunde Zellen, da die O_2 -Konzentration im Medium geringer ist ($40\ \mu\text{mol/l}$ vs. $120\ \mu\text{mol/l}$ nach 3 Stunden). Ausgehend von diesen Rohdaten der SDR-Messung konnte der Sauerstoffverbrauch pro Stunde berechnet werden.

Da für die geplanten Versuche 13 Organe parallel untersucht werden sollten, und nicht aus jedem Organ ausreichend Zellen isoliert werden konnten (z. B. aus gesunden Lymphknoten nur 1,5 – 2,5 Millionen), wurde die Methode in Gewebekultur getestet. Dazu wurden mit Hilfe von Hautbiopsiestanzen Gewebestücke definierter Größe ausgeschnitten und in die Vertiefungen der Messplatte gegeben. Mit zunehmender Größe der Gewebestückchen stieg auch der Sauerstoffverbrauch an, was bestätigte, dass die Messungen des Sauerstoffverbrauchs auch auf diese Weise möglich sind. Der Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit von dem Durchmesser der Biopsiestanze ist von ausgewählten Organen in der folgenden Abbildung dargestellt.

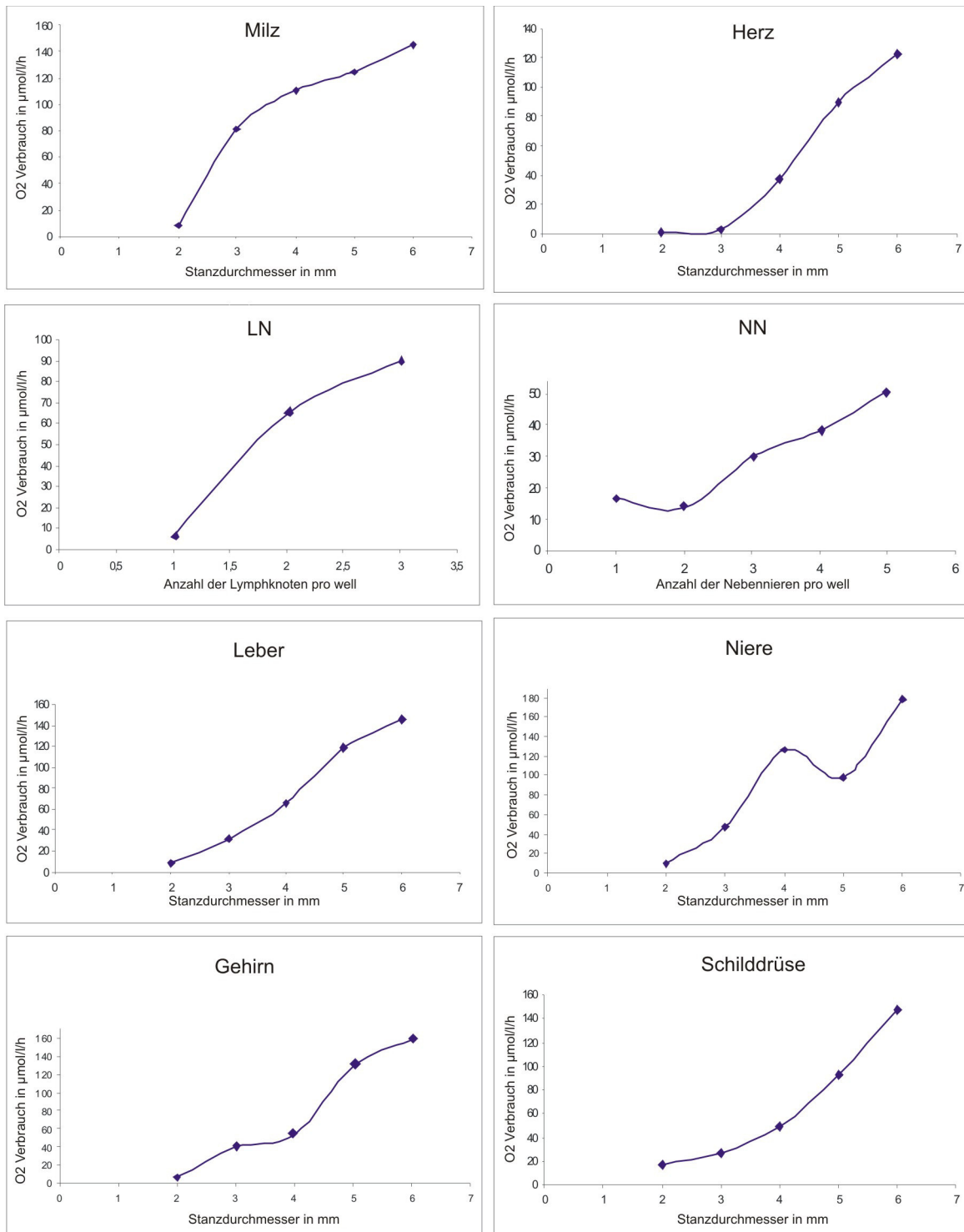


Abbildung 3.3: Sauerstoffverbrauch einzelner Organe in Abhängigkeit des Stanzdurchmessers

Gezeigt ist der Sauerstoffverbrauch von arthritischen Organen in µmol/l/h. Es wird deutlich, dass mit steigendem Durchmesser der Gewebestücke auch der Sauerstoffverbrauch ansteigt. Für drainierende Lymphknoten (LN) und Nebennieren (NN) wurden die Organe im Ganzen in die Kavitäten der Messplatte gegeben.

Anhand dieser Ergebnisse der Voruntersuchungen wurde entschieden, dass für die Sauerstoffverbrauchsmessungen in den Tierversuchen Gewebestücke eines Durchmessers

von 4 mm verwendet werden. Auf diese Weise sollte gewährleistet werden, dass der Sauerstoffgehalt der Proben im Vergleich zum Medium (ca. 180 $\mu\text{mol/l}$) messbar bleibt. Nach erfolgreicher Etablierung dieser Hochdurchsatz-Methode zur Sauerstoffmessung wurde diese im Krankheitsverlauf der experimentellen Arthritis angewandt. Dazu wurden insgesamt 13 verschiedene Organe untersucht. In der folgenden Übersichtsgrafik ist der Sauerstoffverbrauch in gesunden (Kontrolle) und arthritischen Organen (CIA) dargestellt:

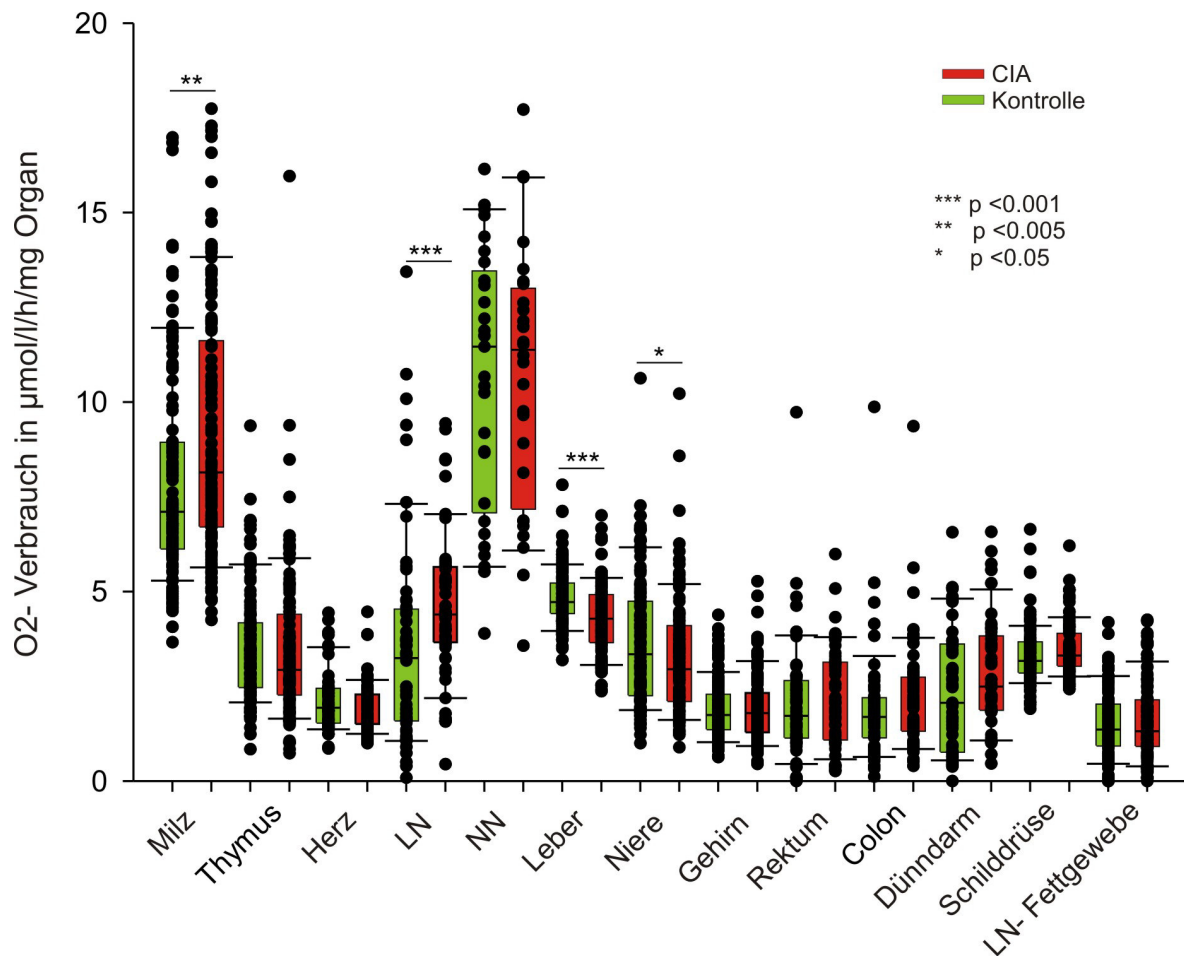


Abbildung 3.4: Überblick des Sauerstoffverbrauchs in arthritischen und gesunden Organen

Gezeigt ist der Sauerstoffverbrauch von verschiedenen Organen von männlichen DBA1/J Mäusen. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 55 Tagen beobachtet und der Sauerstoffverbrauch zu bestimmten Zeitpunkten gemessen (Tag 0, 5, 14, 21, 25, 28, 35, 40 und 55). Von jedem Organ wurden jeweils von 2 Organstückchen pro Versuchstag der Sauerstoffverbrauch und das Gewicht bestimmt. Lymphknoten (LN) und Nebennieren (NN) wurden als Ganzes untersucht. Jeder Punkt stellt den Sauerstoffverbrauch eines Organstückchens dar (n = 120, außer für LN: n = 60, für NN: n = 30). Gezeigt sind Box Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile (MWU-Test).

Signifikante Unterschiede des Sauerstoffverbrauchs pro mg Organ zwischen den gesunden Kontrolltieren und arthritischen Tieren konnten in Milz, Lymphknoten, Leber und Niere festgestellt werden, wobei in Leber und Niere der Sauerstoffverbrauch in arthritischen

Tieren erniedrigt war. Die übrigen gesunden Organe zeigten keine Unterschiede im Energieverbrauch im Vergleich zu arthritischen Tieren.

3.1.1 Arthritis und Sympathektomie: Bedeutung des sympathischen Nervensystems

Im folgenden Versuchsblock wurden die Energieverbrauchsmessungen in sympathektomierten Tieren durchgeführt. Die Mäuse wurden wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben, eine Woche vor der Immunisierung (Tag 0) sympathektomiert. In diesem Experimentblock wurden nicht alle 13 oben genannten Organe untersucht, sondern nur Milz, Thymus, Lymphknoten, Leber, Niere und Gehirn. Die Organe wurden an den Versuchstagen 0, 5, 14, 21, 25, 28, 35, 40 und 55 entnommen, um so den Sauerstoffverbrauch im Verlauf der experimentellen Arthritis und in sympathektomierten Tieren beurteilen zu können. Pro Versuchstag wurden in der Kontrollgruppe 6 Tiere und in den sympathektomierten Versuchsgruppen 3 Tiere in die Messungen einbezogen. Vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass eine frühe Sympathektomie (SYX) zu einem milderen Krankheitsverlauf der experimentellen Arthritis führt (59;122). In diesen Tieren ist das sympathische Nervensystem, welches maßgeblich an der Bereitstellung energiereicher Substrate (Freisetzung von freien Fettsäuren durch β 2-adrenerge Lipolyse im Fettgewebe) beteiligt ist, ausgeschaltet. Es sollte hier untersucht werden, ob und wie sich der Energieverbrauch in einzelnen Organen nach Sympathektomie ändert. Erste Anzeichen der Arthritis konnten ab Tag 21 in der CIA Gruppe beobachtet werden. In der SYX Gruppe wurden erste Anzeichen von Gelenkschwellung und Rötung erst ab Tag 28 nach Immunisierung sichtbar, was eine weniger stark ausgeprägte Arthritis in dieser Gruppe verdeutlicht. Der höchste Score betrug 25 Punkte in der Arthritis Gruppe und 12 Punkte in den sympathektomierten Tieren (Abb. 3.5). Sympathektomie ohne eine Immunisierung der Tiere löste keine Arthritis aus. Der Sauerstoffverbrauch im Verlauf der Arthritis wurde in gesunden Kontrolltieren, arthritischen Tieren und sympathektomierten (Kontrolle-Sympathektomie und CIA-Sympathektomie) Tieren untersucht (Abbildungen 3.6 und 3.7). Die Organentnahme am Tag 0 erfolgte 6 Stunden nach der Immunisierung.

Zum einen wurde der Sauerstoffverbrauch über den Verlauf der Krankheit dargestellt (Abb. 3.6 und 3.7 A, C, E), und zum anderen wurden zur Übersicht alle Daten der einzelnen Versuchstage einer Gruppe in Box Plots aufgetragen und der statistischen Analyse unterzogen (Abb. 3.6 und 3.7 B, D, F).

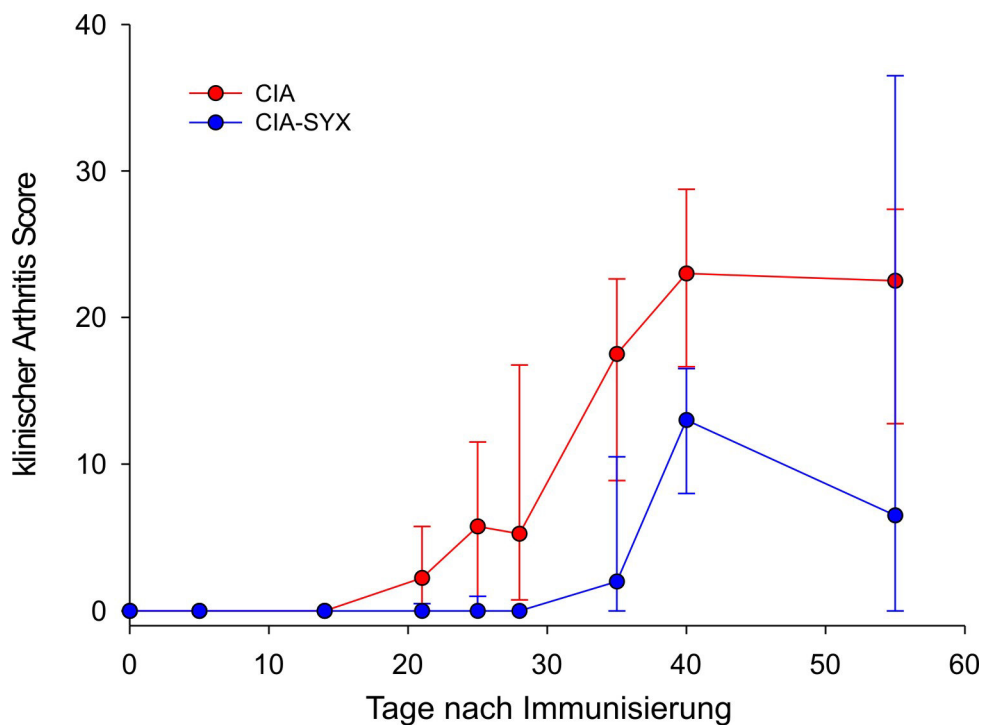


Abbildung 3.5: Frühe Sympathektomie mildert die experimentelle Arthritis

Gezeigt ist der Verlauf des klinischen Arthritis Scores in arthritischen Tieren (CIA, rot) und sympathektomierten Tieren (CIA-SYX, blau). Pro Zeitpunkt wurde der Score von 6 CIA Tieren und 3 CIA-SYX Tieren ermittelt. Dargestellt ist der Median mit 25. und 75. Perzentil. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe (59).

Der Sauerstoffverbrauch wurde als Verbrauch des Gesamtorgans in $\mu\text{mol/l/h}$ bezogen auf das Körpergewicht (KG) der Tiere angegeben. In arthritischen Lymphknoten (rote Linie in Abb. 3.6 E) war der Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu gesunden (grüne Linie) schon 6 Stunden nach der Immunisierung merklich bis Tag 55 erhöht. In sympathektomierten Tieren (blaue Linien) wurde ebenfalls ein erhöhter Sauerstoffverbrauch gemessen, der über den gesamten Beobachtungszeitraum von Tag 0 bis 55 auf diesem Level blieb. Die gleichen Beobachtungen wurden auch in der Milz gemacht (Abb. 3.6 A, B). Der Sauerstoffverbrauch im Thymus ergab keine Unterschiede zwischen gesunden und arthritischen Tieren (Abb. 3.6 D). Hier schien es, dass durch Sympathektomie der Energieverbrauch im Thymus erniedrigt ist (Abb. 3.6 C). In der arthritischen und sympathektomierten Leber wurde ein verminderter Energieverbrauch im Vergleich zum gesunden Organ festgestellt (Abb. 3.7 A und 3.7 B). In der Niere konnten keine Unterschiede zwischen gesunden und arthritischen Nieren festgestellt werden. Die Sympathektomie scheint auch hier den Energieverbrauch herabzusetzen (Abb. 3.7. C, D). Das Gehirn zeigte keine Änderungen des Sauerstoffverbrauchs im Verlauf der Arthritis zwischen den vier untersuchten Gruppen (Abb. 3.7 E, F).

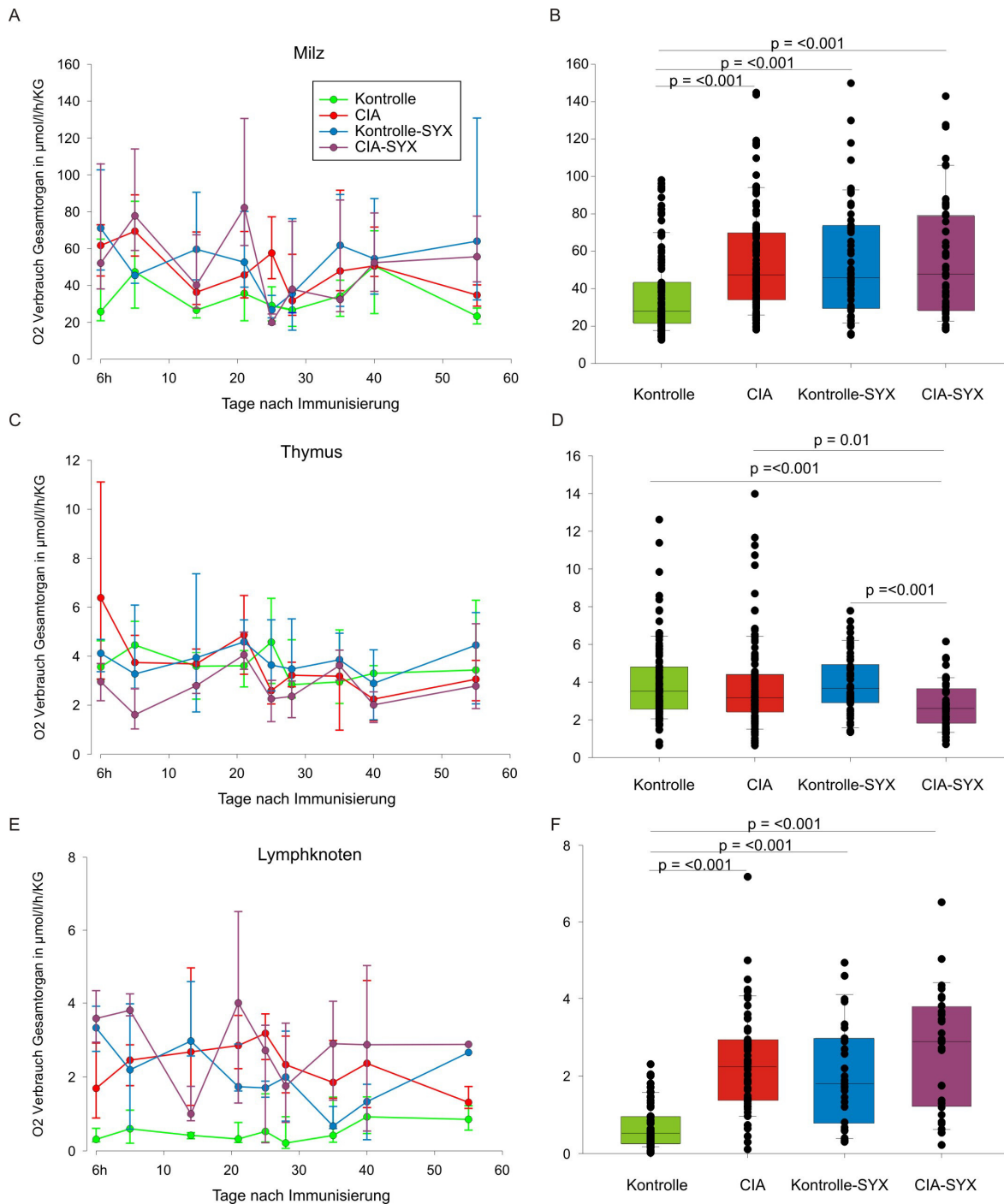


Abbildung 3.6 Sauerstoffverbrauch im Verlauf der experimentellen Arthritis in Milz, Thymus und Lymphknoten in arthritischen und sympathektomierten Tieren

Die Grafiken A, C und E zeigen den Sauerstoffverbrauch im Zeitverlauf der Arthritis in DBA1/J Mäusen. An jedem Versuchstag wurden 6 Kontroll- und arthritische Tiere, sowie 3 sympathektomierte Tiere untersucht. Gezeigt ist der Median mit 25. und 75. Perzentil. In den Grafiken B, D und F wurden alle Sauerstoffverbrauchswerte der einzelnen Gruppen von jedem Versuchstag in Box Plots zusammengefasst. Jeder Punkt zeigt den O₂-Verbrauch eines Organstücks (n Kontrolle und CIA = 108; n SYX = 54). Der Sauerstoffverbrauch der Lymphknoten wurde direkt im gesamten Organ gemessen (n Kontrolle und CIA = 54, n SYX = 27). Gezeigt sind Box Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile (MWU-Test). Abkürzungen: CIA, Kollagen Typ II induzierte Arthritis; KG, Körpergewicht; SYX, frühe Sympathektomie.

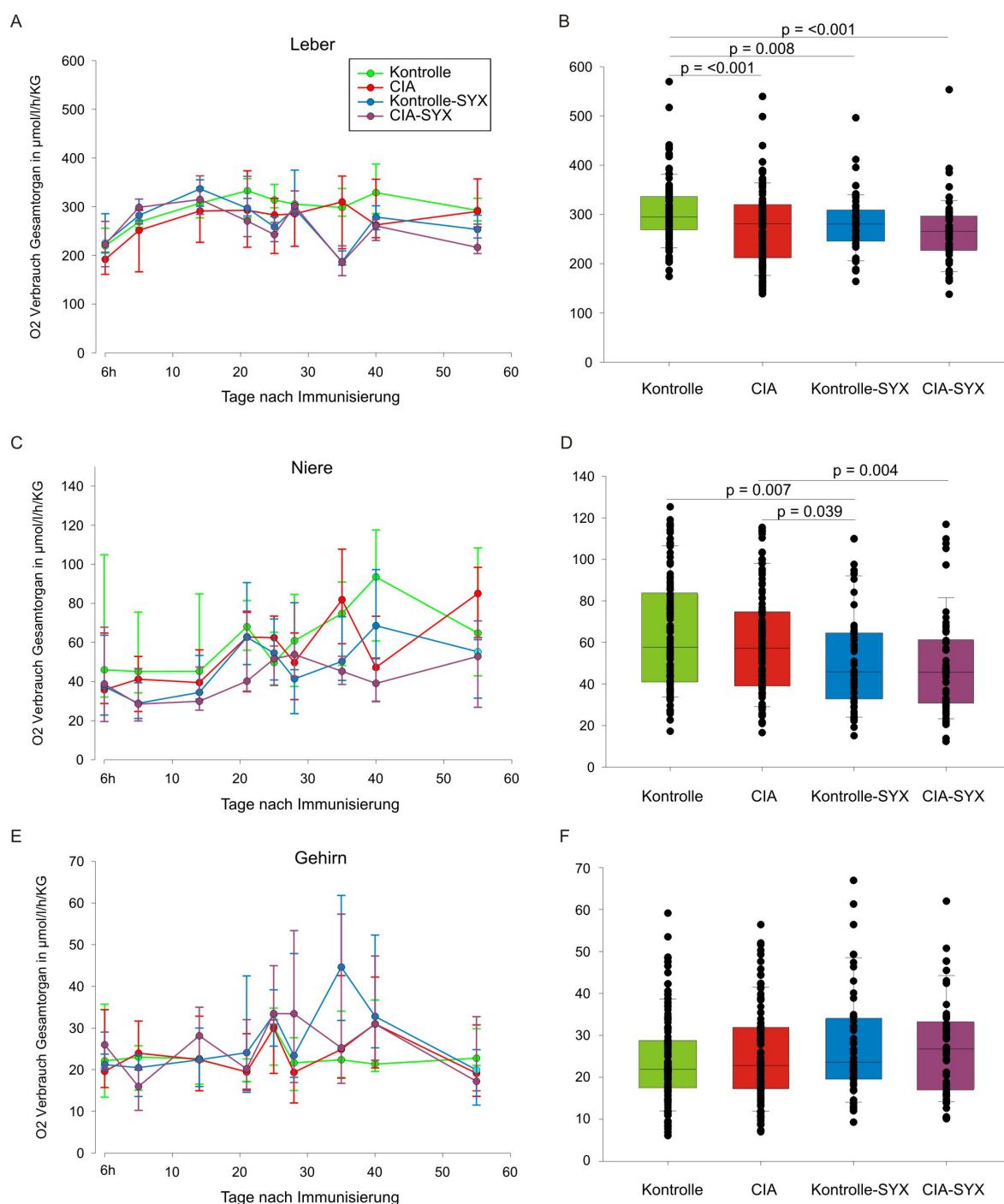


Abbildung 3.7 Sauerstoffverbrauch im Verlauf der experimentellen Arthritis in Leber, Niere und Gehirn in arthritischen und sympathektomierten Tieren

Die Grafiken A, C und E zeigen den Sauerstoffverbrauch im Zeitverlauf der Arthritis in DBA1/J Mäusen. An jedem Versuchstag wurden 6 Kontroll- und arthritische Tiere, sowie 3 sympathektomierte Tiere untersucht. Gezeigt ist der Median mit 25. und 75. Perzentil. In den Grafiken B, D und F wurden alle Sauerstoffverbrauchswerte der einzelnen Gruppen von jedem Versuchstag in Box Plots zusammengefasst. Jeder Punkt zeigt den O₂-Verbrauch eines Organstücks (n Kontrolle und CIA = 108; n SYX = 54). Gezeigt sind Box Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile (MWU-Test). Abkürzungen: CIA, Kollagen Typ II induzierte Arthritis; KG, Körpergewicht; SYX, frühe Sympathektomie.

Die Milz und drainierende Lymphknoten zeigten in den Sauerstoffverbrauchsmessungen verglichen mit Kontrolltieren einen signifikanten Anstieg in arthritischen und sympathektomierten Tieren. Auch die Organgewichte stiegen durch Arthritis und Sympathektomie an (Abb. 3.8), was als ein Zeichen der Zunahme von Zellen in lymphatischen Organen bei arthritischen Tieren sein kann. Bei sympathektomierten Tieren dagegen könnte das erhöhte Organgewicht durch eine Retention von Zellen hervorgerufen werden.

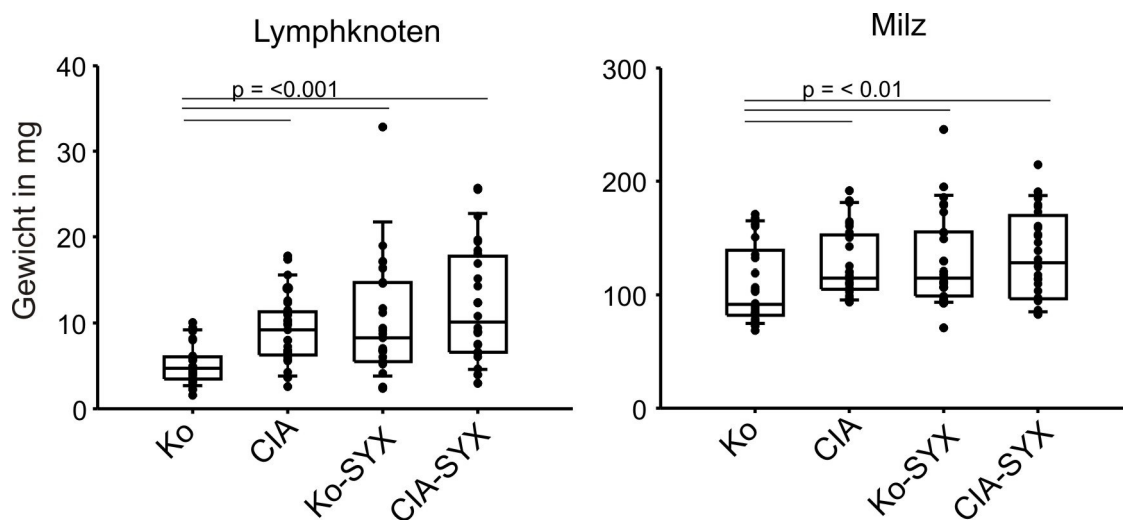


Abbildung 3.8: Organgewichte von Lymphknoten und Milz

Jeder Punkt zeigt das Organgewicht eines Tieres (n = 30). Die Box Plots zeigen die 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile. Der MWU-Test wurde zum Vergleich der Gruppen verwendet. Abkürzungen: CIA, Kollagen Typ II induzierte Arthritis; Ko, Kontrolle; SYX, frühe Sympathektomie.

Vom Versuchstag 35 bis 55 wurde das Gewicht des Fettgewebes, welches die Lymphknoten umgibt, untersucht. Dieser Parameter könnte Aufschluss darüber geben, ob durch frühe Sympathektomie die Lipolyse gesteigert wird (Abnahme des Fettgewichtes). Es konnte gezeigt werden, dass die Fettgewichte durch Krankheit abnehmen. Es bestand jedoch kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und sympathektomierten Tieren, was vermuten lässt, dass das SNS weniger wichtig für die Lipolyse ist (Abb. 3.9). Das umliegende Fettgewebe der Lymphknoten wurde vorsichtig mit einem Skalpell entfernt (123).

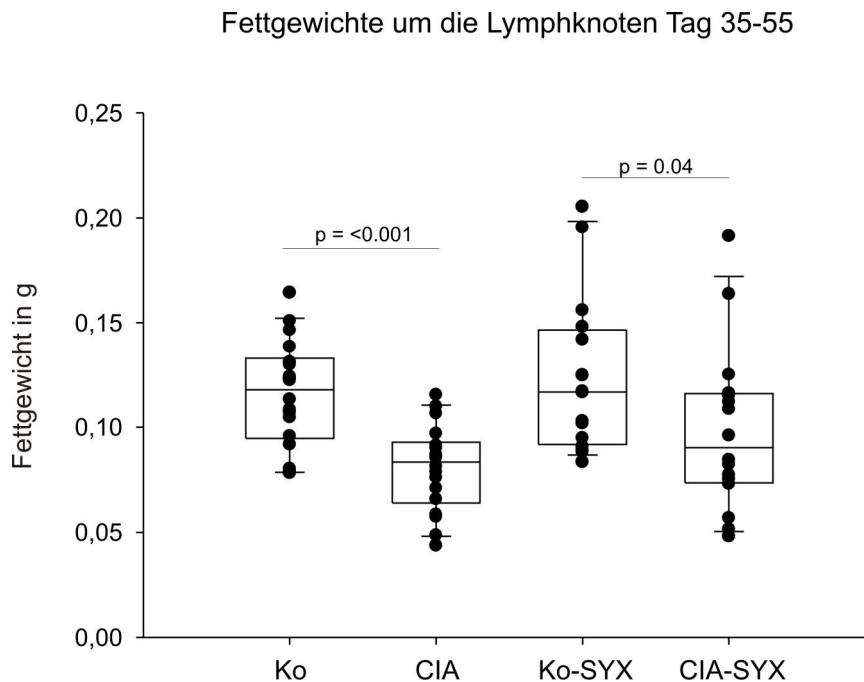


Abbildung 3.9: Gewichte des umliegenden Fettgewebes der Lymphknoten in arthritischen und sympathektomierten Tieren

Die Fettgewichte wurden an drei Versuchstagen (Tag 35, 40, 55) von gesunden, arthritischen, und sympathektomierten Mäusen bestimmt ($n = 18$). Ein Punkt steht für das Fettgewicht einer Maus. Gezeigt sind Box Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile (MWU-Test). Abkürzungen: CIA, Kollagen Typ II induzierte Arthritis; Ko, Kontrolle; SYX, frühe Sympathektomie.

3.1.2 Arthritis in *Atgl*-KO Mäusen: Bedeutung der Lipolyse

In diesem Versuchsblock wurde eine Arthritis in ATGL (Adipozyten Triglycerid Lipase)-Knockout Mäusen (C57BL/6 Hintergrund) ausgelöst. Mäuse des *Atgl*^{-/-} Phänotyps ähneln den der β -adrenergen Rezeptor defizienten Mäusen in ihrer Unfähigkeit Fettsäuren aus Triglyzeriden freizusetzen (65;66), d.h., wenn diese Lipase nicht vorhanden ist, werden unzureichende Mengen an freien Fettsäuren als energiereiche Substrate für die mitochondrielle oxidative Phosphorylierung produziert. Insofern sollte der Energieverbrauch bei *Atgl*^{-/-} Mäusen und die Krankheitsaktivität deutlich reduziert sein, was hier im Krankheitsverlauf getestet wurde. Es wurde bisher nicht untersucht, wie sich verminderte Energiebereitstellung auf den Verlauf der Krankheit auswirkt. Die Sauerstoffmessungen wurden in Organen von heterozygoten Tieren (*Atgl*^{+/-}) durchgeführt und mit dem Wildtyp (WT) C57BL/6 verglichen. In diesem Versuchsblock wurden Milz, Lymphknoten, Thymus, Herz, Nebennieren, Leber, Niere, Gehirn, Darm (Rektum, Colon, Dünndarm), Schilddrüse und das umliegende Fettgewebe der Lymphknoten untersucht.

Die Organe wurden an drei Versuchstagen nach der Immunisierung entnommen (Tag 0, 40, 70) und der Sauerstoffverbrauch in Box Plots zusammengefasst.

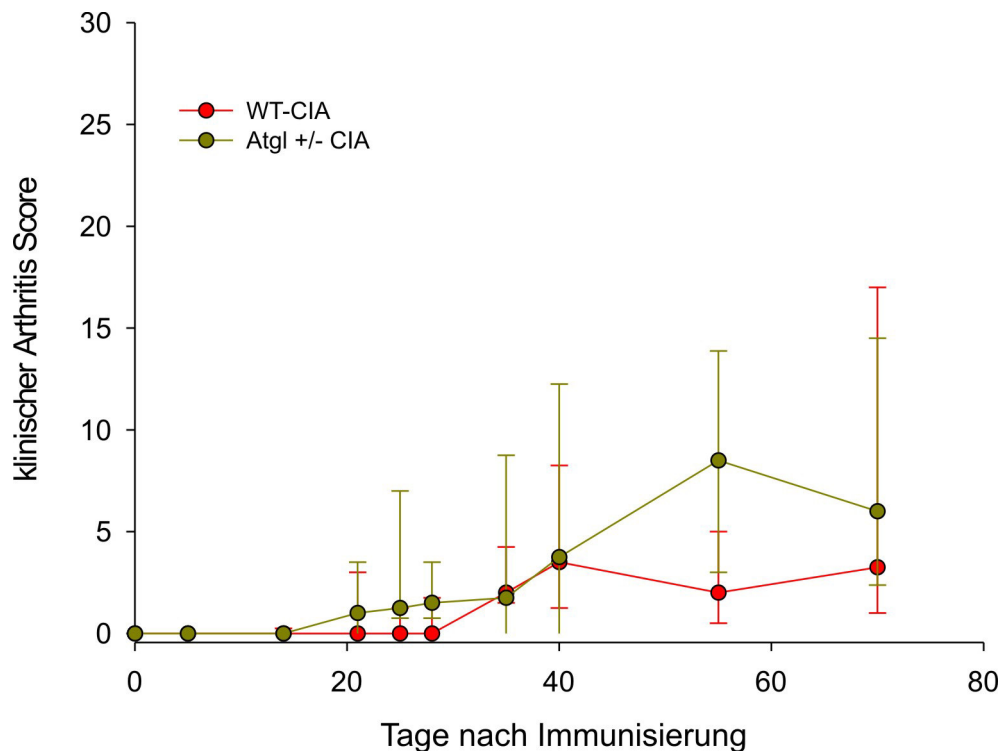


Abbildung 3.10: klinischer Arthritis Score in heterozygoten *Atgl*-KO Tieren und C57BL/6 Wildtyp-Mäusen

Gezeigt ist der Verlauf des klinischen Arthritis Scores in arthritischen C57BL/6 Mäusen (WT-CIA, rot) und heterozygoten *Atgl*- Knockout Mäusen (*Atgl* +/- CIA, braun). Pro Zeitpunkt wurde der Score von 9 Wildtyp Tieren und 6 *Atgl*^{+/-} Tieren ermittelt. Dargestellt ist der Median mit 25. und 75. Perzentil.

Die Arthritis ist in beiden Gruppen weniger stark ausgeprägt als bei DBA1/J Mäusen. Der höchste Score lag durchschnittlich bei 10 Punkten (Maximum: 52). Das Fehlen der ATGL scheint den Krankheitsverlauf im Vergleich zu Wildtyp Tieren nicht zu mildern. Trotzdem konnte in mehreren Organen eine deutliche Zunahme des Sauerstoffverbrauchs bei Krankheit in WT und *Atgl*^{+/-} Tieren festgestellt werden (Abbildungen 3.11 und 3.12). Wie auch in DBA1/J Mäusen, wurde in Milz und Lymphknoten ein Anstieg des O₂-Verbrauchs beobachtet. Das war auch in den Nebennieren der Fall, wobei die Messungen in DBA1/J Tieren keine Unterschiede ergaben. Interessant ist auch ein höherer Sauerstoffverbrauch in Leber und Niere bei Krankheit in beiden Gruppen, im Gegensatz zu dem erniedrigten O₂-Verbrauch in der arthritischen DBA1/J Leber. Es konnten hier auch Unterschiede zwischen gesunden und kranken *Atgl*^{+/-} Tieren festgestellt werden. Dies könnte aufgrund gesteigerter Gluconeogenese auftreten, da die Energiebereitstellung durch Lipolyse im Krankheitsverlauf von *Atgl*^{+/-} Tieren gestört ist. Im *Atgl*^{+/-} Herz ist der Sauerstoffverbrauch im

Vergleich zum Wildtyp unabhängig von der Arthritis deutlich verringert. Die eingeschränkte Energiebereitstellung kann durch voranschreitende Herzverfettung in den Knockout Tieren erklärt werden, die mit eingeschränkter Lebenserwartung der Tiere einhergeht (65;66).

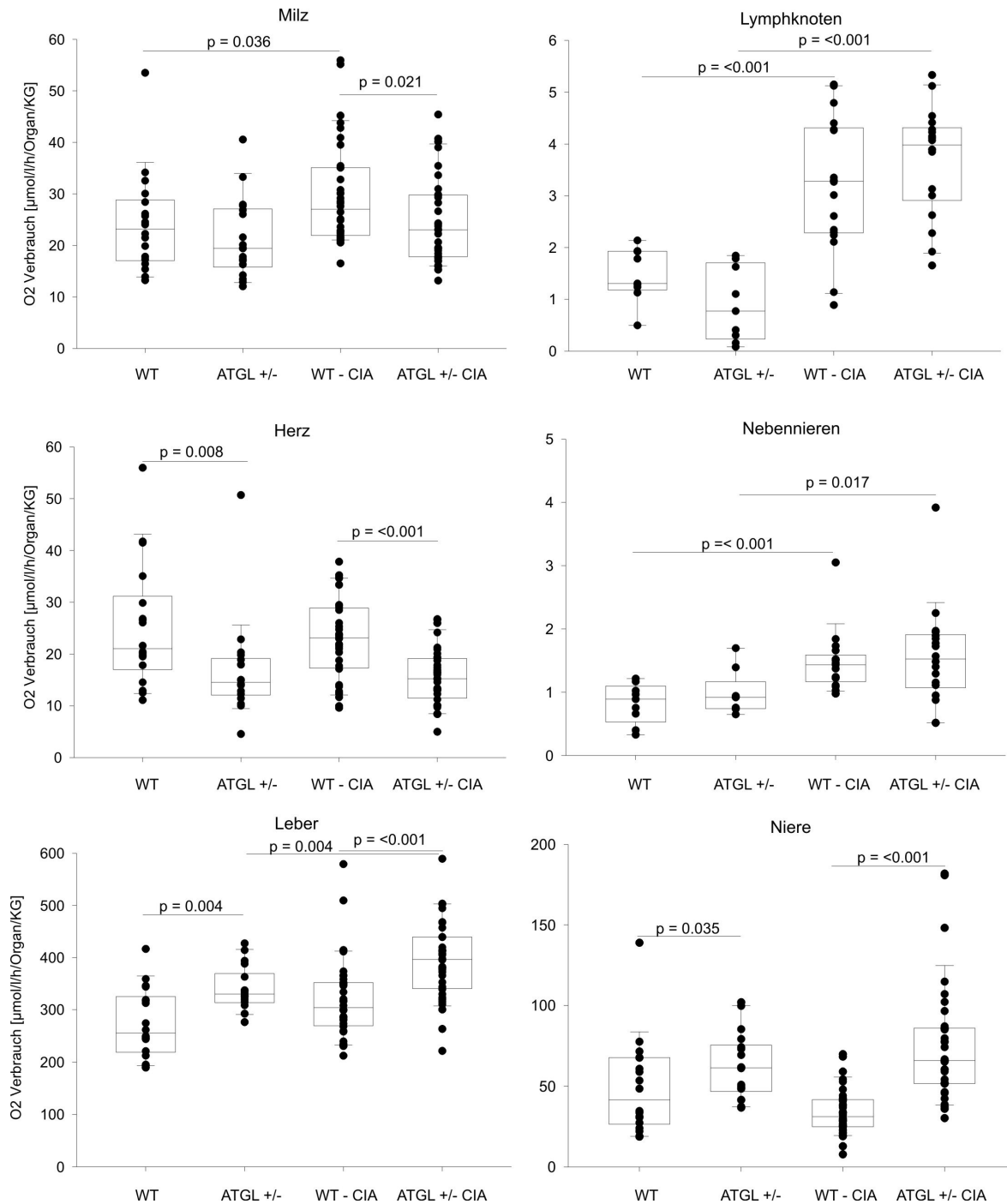


Abbildung 3.11: Sauerstoffverbrauch bei Arthritis in Wildtyp und *Atgl*^{+/-} Mäusen (1)

Gezeigt ist der Sauerstoffverbrauch von Milz, Lymphknoten, Herz, Nebennieren, Leber und Niere in gesunden Wildtyp C57BL/6 Mäusen (WT) und heterozygoten *Atgl*-Knockout Mäusen („ATGL +/-“) verglichen mit arthritischen (CIA) Tieren. Jeder Punkt zeigt den O₂-Verbrauch eines Organstücks (n WT und *Atgl*^{+/-} Kontrolltiere = 18; n CIA = 36; LN und NN n Kontrolle = 9, n CIA = 18). Dargestellt sind Box Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile (MWU-Test).

Kranke Wildtyp Tiere zeigten auch einen deutlich höheren Sauerstoffverbrauch im Darm (Abb. 3.12). In *Atgl*^{+/-} Tieren war dies nur im Rektum und Colon zu beobachten. Der Sauerstoffverbrauch im Rektum war in *Atgl*^{+/-} Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen

erniedrigt, im Dünndarm jedoch erhöht. Dies lässt vermuten, dass der Darm in C57BL/6 Mäusen immunologisch stark an der Arthritis beteiligt ist. Die Schilddrüse zeigte in arthritischen *Atgl*^{+/-} Tieren im Vergleich zu arthritischen Tieren des Wildtyps eine Verminderung des Sauerstoffverbrauchs. Im umliegenden Fettgewebe der Lymphknoten konnten keine Unterschiede hinsichtlich des O₂-Verbrauchs zwischen Wildtypen und *Atgl*^{+/-} Tieren beobachtet werden. Bei Krankheit nimmt dieser jedoch ab. Betrachtet man die Fettgewichte des umliegenden Fettgewebes der Lymphknoten (Abb. 3.12, graue Boxen), so ist erkennbar, dass schon heterozygote Knockout-Tiere, wie sie in diesem Versuchsblock verwendet wurden, Defekte der Lipolyse aufweisen, da die Fettmasse im Vergleich zu Wildtyp Tieren signifikant erhöht ist. Der Sauerstoffverbrauch zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen in Thymus und Gehirn (nicht gezeigt).

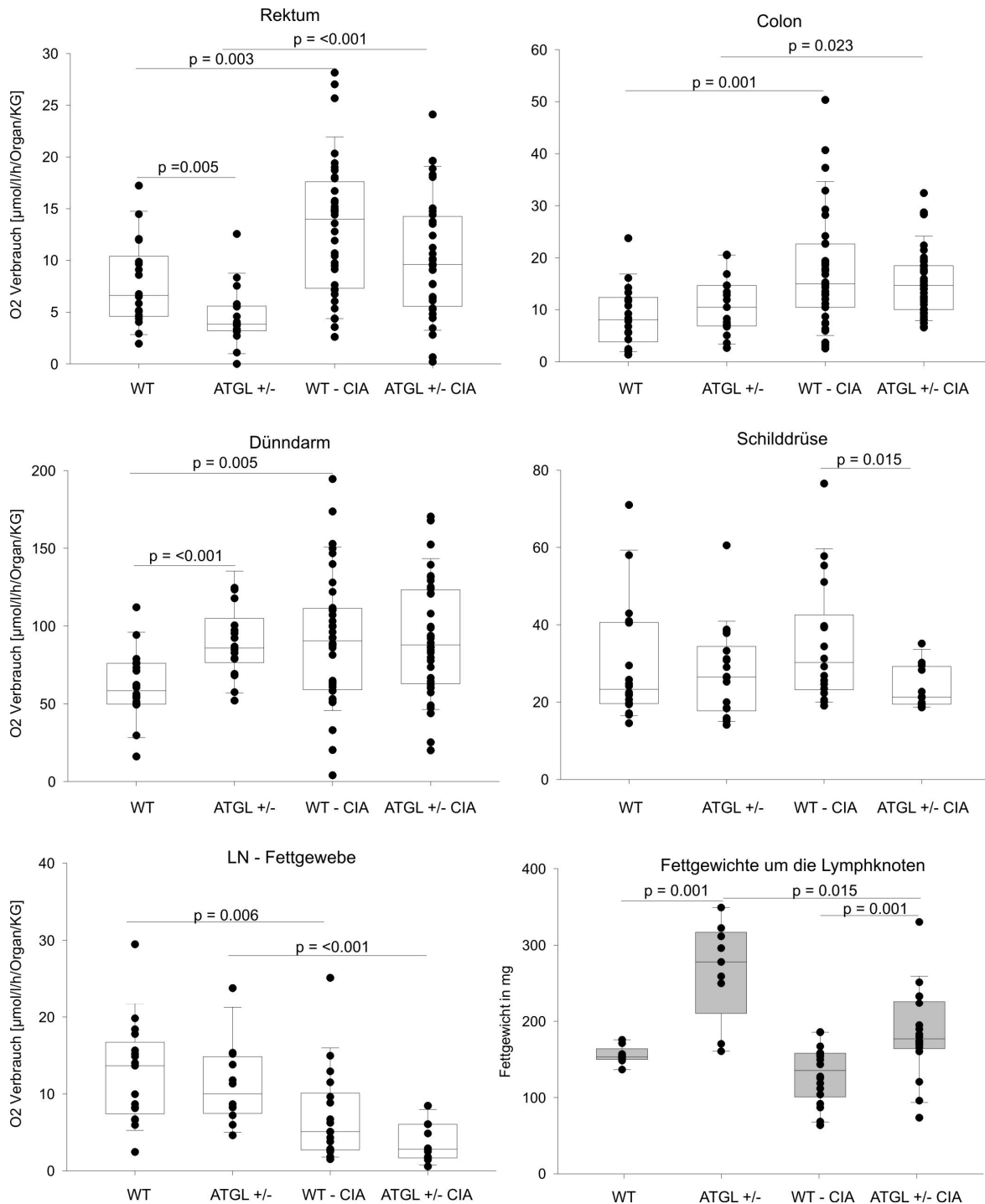


Abbildung 3.12: Sauerstoffverbrauch bei Arthritis in Wildtyp und *Atgl*^{+/-} Mäusen (2)

Gezeigt ist der Sauerstoffverbrauch von Rektum, Colon, Dünndarm, Schilddrüse und dem umliegenden Fettgewebe der Lymphknoten (LN-Fettgewebe) in gesunden Wildtyp C57BL/6 Mäusen (WT) und heterozygoten *Atgl*-Knockout Mäusen („ATGL+/-“,) verglichen mit arthritischen (CIA) Tieren. Jeder Punkt zeigt den O₂-Verbrauch eines Organstücks (n WT und *Atgl*^{+/-} Kontrolltiere = 18; n CIA = 36). Unten rechts sind die Fettgewichte des umliegenden Fettgewebes der Lymphknoten aufgetragen (graue Boxen). Jeder Punkt repräsentiert das Fettgewicht eines Tieres (n WT und *Atgl*^{+/-} Kontrolltiere = 9; n CIA = 18). Dargestellt sind Box Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile (MWU-Test).

3.1.3 Arthritis und Kältezittern: Auslösen einer Energieumverteilung mittels Icilin

In diesem Experiment sollte der Energiehaushalt gezielt durch eine Therapie verändert werden, und so dem Immunsystem eine geringere Menge an energiereichen Substraten zur Verfügung zu stellen. Dazu wurden arthritische DBA1/J Mäuse mit Icilin behandelt. Icilin ist ein Agonist am Kälterezeptor TRPM8 (*transient receptor potential melastatin 8*). TRPM8 ist ein Ionenkanal, der zur Familie der TRP Familie gehört und durch Kältereize aktiviert wird. Es wird also Kälte simuliert. Auf diese Weise wird eine starke Energieumverteilungsreaktion ausgelöst. Die Tiere haben nach Aktivierung des TRPM8 durch Icilin sogenannte „wet dog shakes (WDS)“ und erzeugen eine Hyperthermie durch *shivering* und *non-shivering thermogenesis*. Da der Körper die Energie für Wärmeproduktion benötigt, geht diese dem Immunsystem verloren. Gibt man also Icilin vor Immunisierung, so konzentriert sich der Körper auf die Wärmegenerierung und „vernachlässigt“ möglicherweise das Immunsystem. Die Hypothese lautet: Die Tiere sollten dann eine mildere Arthritis entwickeln.

Die Mäuse wurden sieben Tage lang um den Immunisierungszeitraum von Tag -3 bis +3 (an Tag 0 fand die Immunisierung statt) morgens und abends mit Icilin (15 mg/kg KG) behandelt. Um Gewöhnungseffekte der Behandlung ausschließen zu können, wurde zunächst die Körpertemperatur der Tiere s.c. und i.p. mit Hilfe von Temperaturtranspondern vor Icilin Gabe (0 min), sowie 15, 30, 45, 60 und 120 Minuten nach der Icilin-Injektion gemessen.

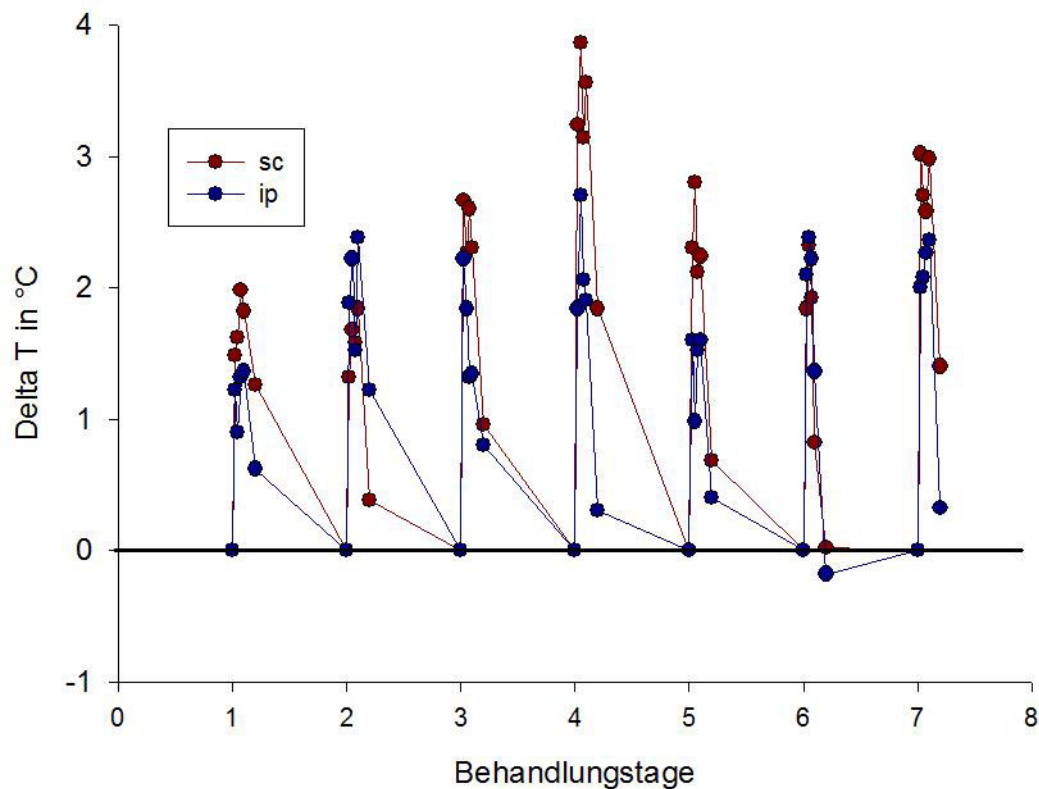


Abbildung 3.13: Icilin induzierte Hyperthermie in DBA1/J Mäusen

Exemplarisch gezeigt ist der Verlauf der Körpertemperatur nach morgendlicher Icilin Gabe einer Maus. Die Temperatur wurde sowohl subkutan (sc), als auch intraperitoneal (ip) nach 15, 30, 60 und 120 Minuten (Behandlungstag 1,025; 1,05; 1,075; 1,1; 1,2) bestimmt.

Wie in vorheriger Abbildung erkennbar ist, konnten Gewöhnungseffekt durch die regelmäßige Behandlung ausgeschlossen werden. In der Kontrollgruppe, welcher das Vehikel anstelle von Icilin injiziert wurde, konnten auch Temperaturänderungen in den Tieren festgestellt werden. Diese waren jedoch signifikant niedriger als in der Icilin Gruppe (Abb. 3.14) und wurden wahrscheinlich durch das Handling der Tiere ausgelöst.

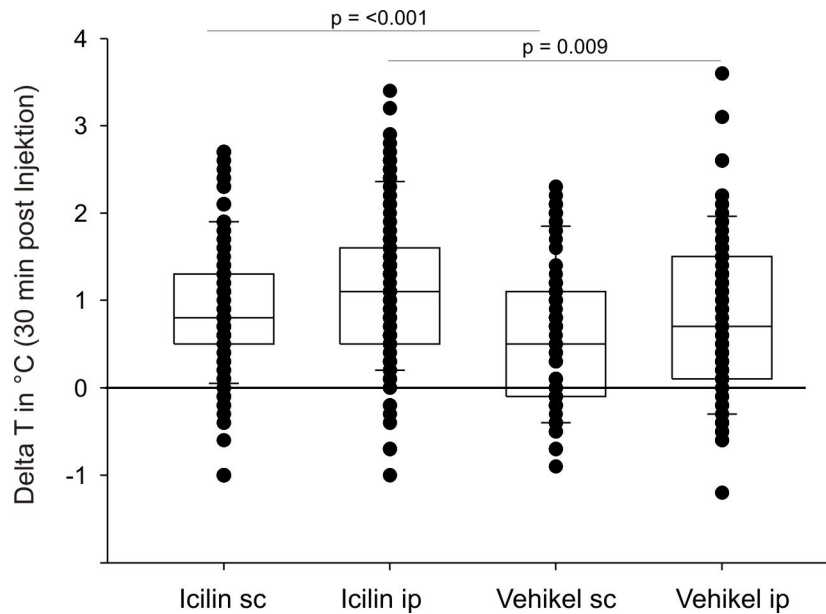


Abbildung 3.14: Änderung der Körpertemperatur 30 Minuten nach Icilin bzw. Vehikel Gabe
Die Temperatur wurde an allen sieben Behandlungstagen jeweils morgens und abends gemessen. Die Icilin Gruppe enthielt 10 und die Vehikel Gruppe 6 Tiere. In jeder Box sind die Werte der Körpertemperatur aller morgens und abends behandelter Tiere zusammengefasst (n Icilin = 140, n Vehikel = 84). Dargestellt sind Box Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile (MWU-Test).

Weiterhin konnte das durch Icilin ausgelöste Kältezittern durch Einsetzen von „wet dog shakes (WDS)“ beurteilt werden. Im Verlauf der Behandlung war sowohl morgens als auch abends ein Anstieg der Anzahl der WDS in 10 Minuten erkennbar (Abb. 3.15). Eine leichte Akkumulation des Icilins wäre in diesem Fall denkbar. An Tag 0 erfolgte die Immunisierung der Tiere um die Mittagszeit zwischen den Behandlungen. Die einsetzende Immunreaktion der Tiere scheint Einfluss auf die Icilin Wirkung zu haben, da eine Verringerung der WDS Anzahl am Abend von Tag 0 und am Morgen von Tag 1 sichtbar war. In der mit Vehikel behandelten Gruppe wurden keine WDS ausgelöst. Die Beobachtung der Tiere erfolgte nach der einwöchigen Icilin bzw. Vehikel Behandlung bis Tag 40 nach der Immunisierung. Erste Krankheitsanzeichen waren ab Tag 22 nach der Immunisierung sichtbar. Die Arthritis in der Icilin Gruppe fiel signifikant milder aus als in der Vehikel Gruppe. Der höchste Score lag in der Vehikel Gruppe an Tag 40 bei 30 Punkten, die Icilin behandelten Tiere dagegen zeigten nur 20 Punkte (Abb.3.16).

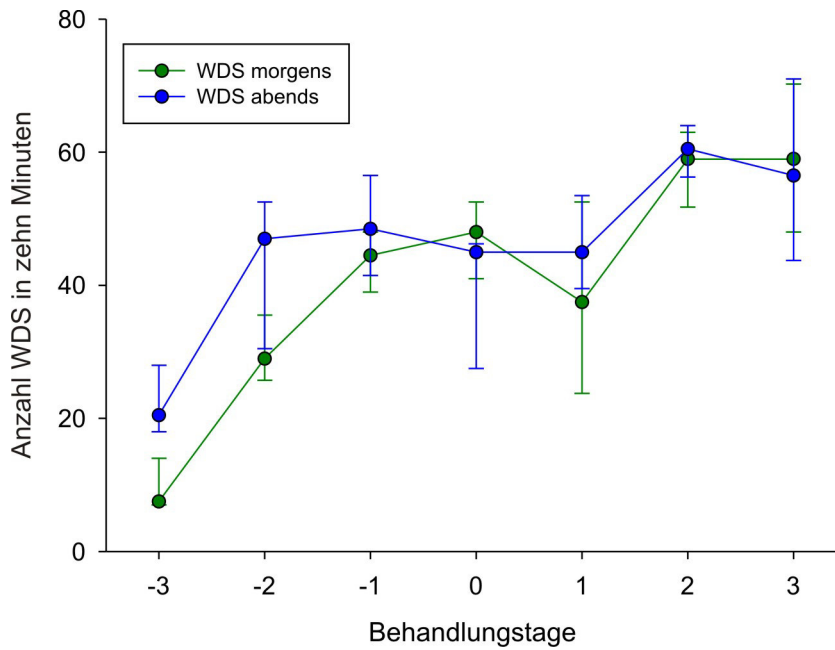


Abbildung 3.15: Icilin induzierte *wet dog shakes* während einwöchiger Behandlung

Die *wet dog shakes* von 10 Mäusen wurden nach der Icilin Gabe morgens und abends 10 Minuten gezählt. Die Daten sind als Median mit 25. und 75. Perzentil dargestellt.

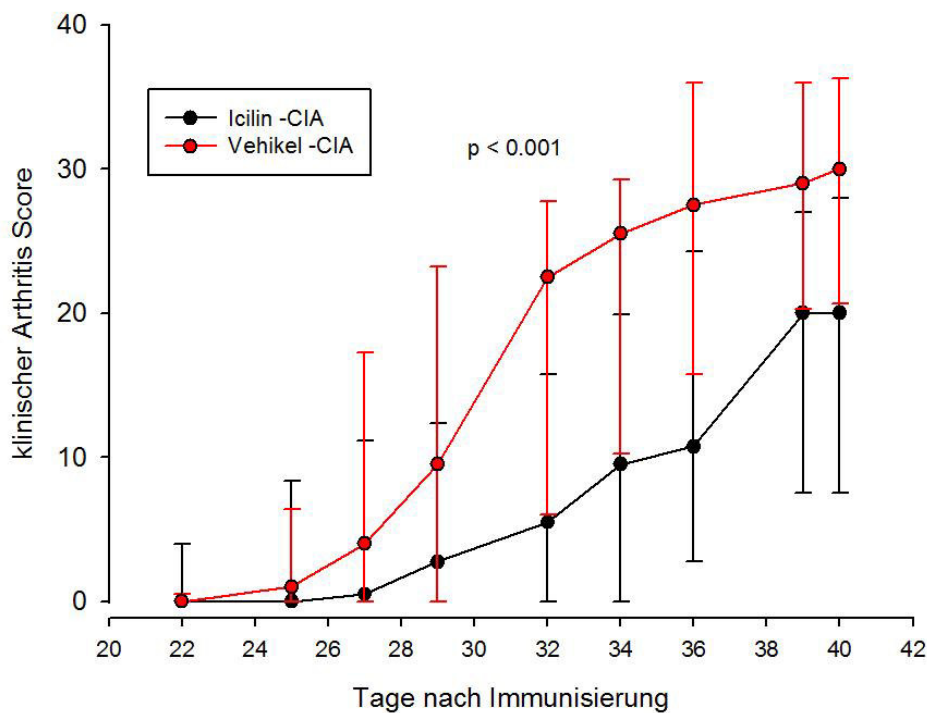


Abbildung 3.16: Frühe Icilin Behandlung mildert die experimentelle Arthritis

Gezeigt ist der Verlauf des klinischen Arthritis Scores in Vehikel behandelten arthritischen Tieren (Vehikel-CIA, rot) und Icilin behandelten Tieren (Icilin-CIA, schwarz). Im Krankheitsverlauf hatten Vehikel behandelte Tiere ($n = 6$) einen signifikant höheren Arthritis Score als Icilin behandelte Tiere ($n = 10$). Die Werte sind als Median mit 25. und 75. Perzentil dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte nach dem general linear model (GLM).

Nach Beendigung des Versuches wurden an Tag 40 Milz, Lymphknoten, Thymus, Herz, Nebennieren, Leber, Niere, Darm, Gehirn, Schilddrüse und das umgebende Fettgewebe der Lymphknoten entnommen und der Sauerstoffverbrauch gemessen. Dieser Zeitpunkt war jedoch zu spät gewählt, da keine Unterschiede im Sauerstoffverbrauch zwischen den zwei Gruppen detektierbar waren. Auch die Lymphknoten- und Milzgewichte zeigten an Tag 40 keine Unterschiede zwischen Vehikel- und Icilin Gruppe. Lediglich in den Nebennieren konnte eine signifikante Verminderung des Sauerstoffverbrauchs in den Icilin behandelten Tieren festgestellt werden, im Gehirn dagegen war ein Anstieg des Sauerstoffverbrauchs in der Icilin Gruppe erkennbar (Abb. 3.17).

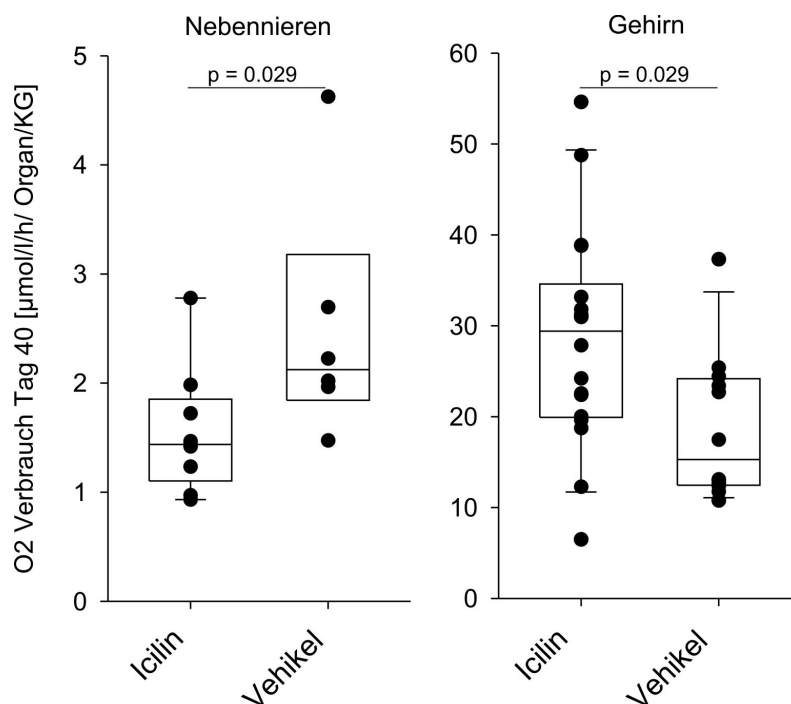


Abbildung 3.17: Frühe Icilin Behandlung mindert den Sauerstoffverbrauch in arthritischen Nebennieren und erhöht diesen im Gehirn

Der Sauerstoffverbrauch wurde an Tag 40 nach Immunisierung gemessen (n Icilin = 9, n Vehikel = 6 für Nebenniere, bzw. 18 und 9 für Gehirn). Die Daten sind als Box Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile dargestellt (MWU-Test).

Die frühe Icilin Behandlung hat einen deutlichen therapeutischen Effekt gezeigt, jedoch müssten Sauerstoffverbrauchsmessungen zu früheren Zeitpunkten (Tag 5 und 14) wiederholt werden.

3.2 Modulation der Zellmigration durch frühe Sympathektomie

In den vorangegangenen SEEC-Messungen konnte bereits gezeigt werden, dass frühe Sympathektomie eine Erhöhung des Organgewichtes von Lymphknoten und Milz zur Folge hat (siehe Abb. 3.8). Des Weiteren nahm der Sauerstoffverbrauch deutlich zu (siehe Abb. 3.6), was vermuten lässt, dass eine Retention von Zellen in den lymphatischen Organen dafür verantwortlich ist und der Sympathikus in den Zielorganen Milz und Lymphknoten eine entscheidende Rolle bei der Modulation der Zellmigration spielt. Im Folgenden Versuch wurde das Migrationsverhalten von *ex vivo* gefärbten Milz- und Lymphknotenzellen in gesunden und sympathektomierten Tieren untersucht.

3.2.1 Zellzahlen von Milz und Lymphknoten

Die Versuche wurden mit gesunden DBA1/J Mäusen durchgeführt. Die Sympathektomie wurde so durchgeführt, als würde eine Immunisierung stattfinden. Die Behandlung erfolgte an Tag -8, -7 und -6 und die Organentnahme erfolgte an Tag 0. Zellen aus Milz und Lymphknoten von gesunden (Kontrolle, Ko) und gesunden sympathektomierten (SYX) wurden isoliert und ausgezählt.

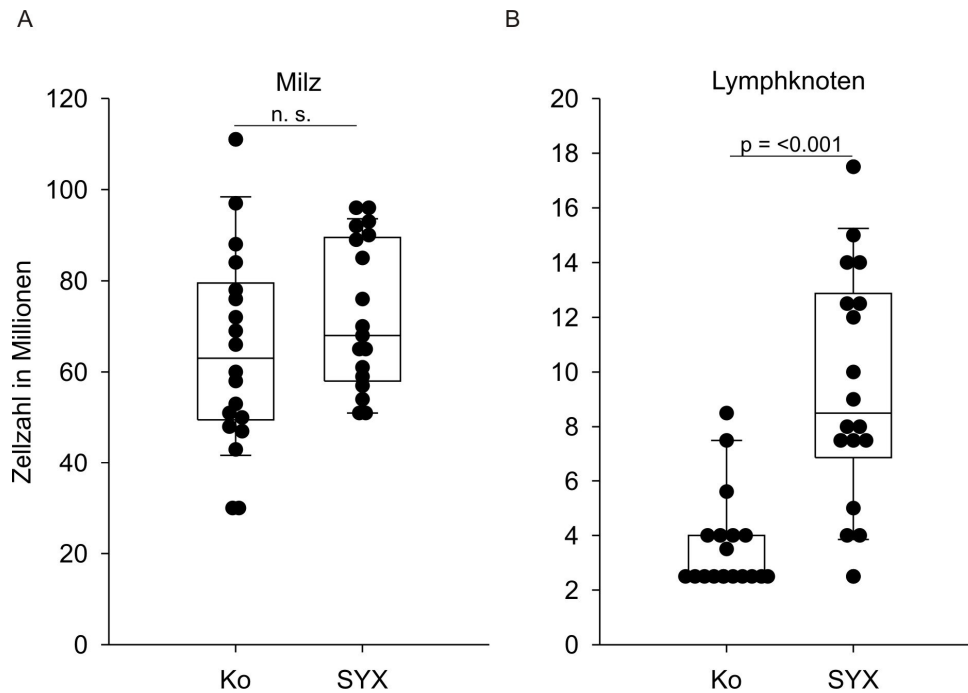


Abbildung 3.18: Frühe Sympathektomie erhöht die Zellzahl in Lymphknoten, nicht in der Milz

Gezeigt sind die Zellzahlen in Millionen in der Milz (A) und in Lymphknoten (B) gesunder (Ko) und sympathektomierter (SYX) DBA1/J Mäuse. Jeder Punkt zeigt die Zellzahl des Organs von einem Tier (n = 18). Die Daten sind als Box Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile dargestellt (MWU-Test). Abkürzungen: Ko, Kontrolle; n. s., nicht signifikant; SYX, Sympathektomie.

Obwohl in früheren Experimenten gezeigt werden konnte, dass die Organgewichte durch Sympathektomie erhöht sind (siehe Abb. 3.8), trifft das nicht für die Zellzahl der Milz von sympathektomierten Tieren zu. In Lymphknoten konnte dagegen eine deutliche Erhöhung der Zellzahl durch Sympathektomie beobachtet werden.

3.2.2 FACS-Analyse von Milz- und Lymphknotenzellen aus Empfängertieren nach Transfer PKH26 markierter Zellen

Die isolierten Zellen wurden mit dem fluoreszenten Farbstoff PKH26 markiert und jeweils 25 Millionen in gesunde und sympathektomierte Empfängertiere reinjiziert. Nach 24 Stunden erfolgte die Organentnahme und die Lymphknoten- und Milzzellen der Empfängertiere wurden mittels FACS analysiert. Es sollte so untersucht werden, ob Sympathektomie das Einwandern von Zellen in sekundäre lymphatische Organe beeinflusst. Die Färbeintensität mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff PKH26 lag im Schnitt bei 95 % (Abb. 3.19).

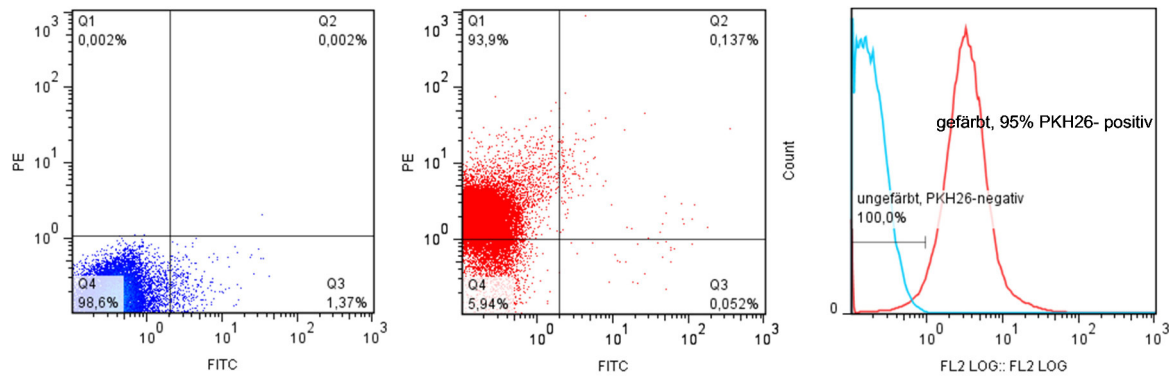


Abbildung 3.19: FACS-Analyse zur Überprüfung der PKH26 Färbeintensität

Gezeigt ist exemplarisch ein Beispiel der Ergebnisse einer PKH26 Färbung von gesunden Milzzellen. Als Negativkontrolle wurden ungefärbte Zellen verwendet. Der Farbstoff wurde in Kanal 2 (FL2, PE, Phycoerythrin) gemessen. Ungefärbte Zellen (blau) sind PE- negativ, gefärbte Zellen (rot) PE-positiv, also PKH26-positiv. Die fast fehlende Überlagerung der Histogramme zeigt die erfolgreiche Färbung der Zellen an. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mittels Overtone Analyse der FlowJo Software.

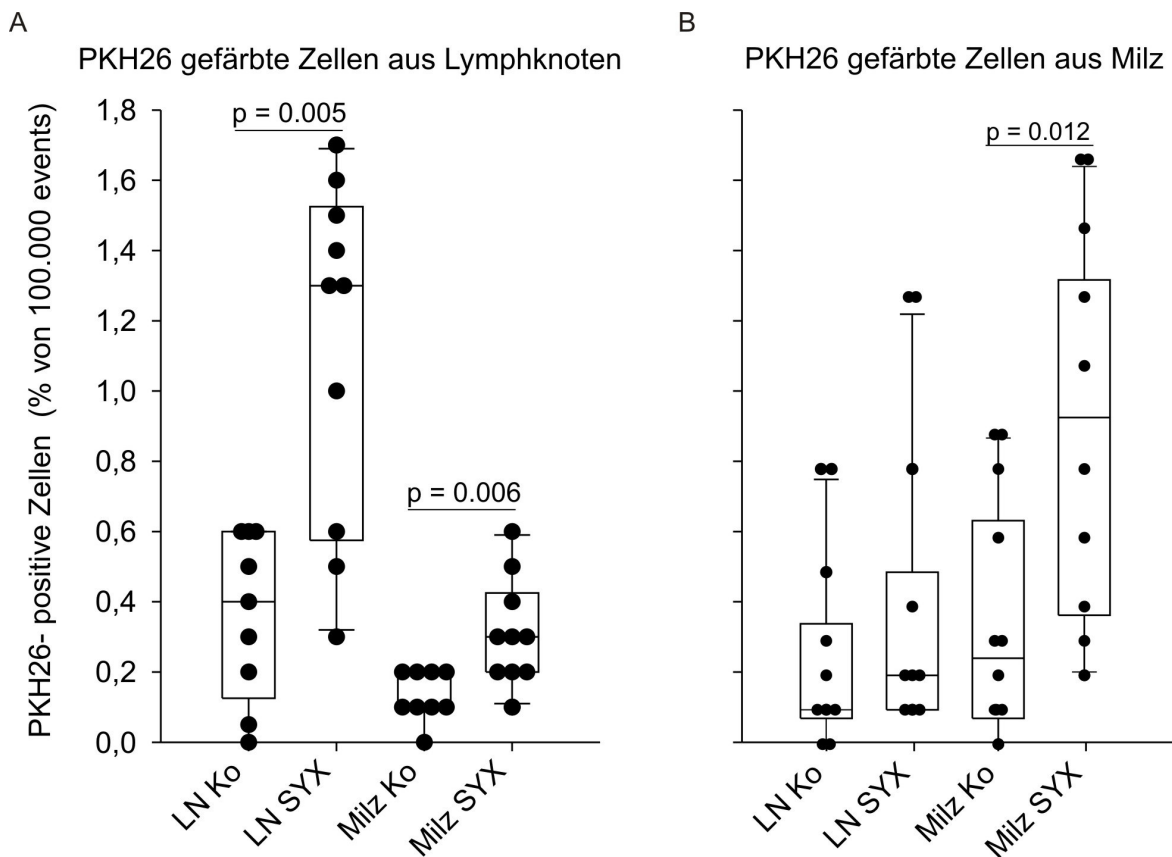


Abbildung 3.20: Sympathektomie erhöht die Zellzahl in sekundären lymphatischen Organen

Nach der intravenösen Injektion von PKH26 gefärbten Lymphknotenzellen (A) bzw. Milzzellen (B) wurden die Organe nach 24 h entnommen und die isolierten Zellen im FACS analysiert. Von jeder Probe wurden 100.000 Zellen gemessen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil PKH26-positiv gefärbter Zellen in Lymphknoten (LN) und Milz von gesunden (Ko) und sympathektomierten (SYX) Tieren. Die Daten sind als Box Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentil dargestellt (MWU-Test). Jeder Punkt entspricht einem untersuchten Organ (A: n Ko = 9, n SYX = 10; B: n Ko/SYX = 10).

Es konnte gezeigt werden, dass sich in sympathektomierten Tieren signifikant mehr reinjizierte und gefärbte Lymphknotenzellen in Lymphknoten und Milz als in Kontrolltieren befinden (Abb. 3.20 A). Wurden gefärbte Milzzellen reinjiziert (Abb. 3.20 B), so war eine erhöhte Frequenz der gefärbten Zellen nur in der Milz von Empfängertieren detektierbar. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das SNS insbesondere in Lymphknoten das Auswandern der Zellen reguliert (Abnahme der Zellzahl durch Auswandern aus den Lymphknoten).

3.3 Auswirkungen auf die Expression von Zelladhäsionsmolekülen in Milz und Lymphknoten nach Sympathektomie

Das Einwandern von Lymphozyten in die Lymphknoten erfolgt hauptsächlich über HEVs und benötigt ein Zusammenspiel von Zelladhäsionsmolekülen (CAM), den Selektinen, Chemokinen und Integrinen. Die wichtigsten Schritte werden dabei von L-Selektin (CD62L), *leukocyte function-associated antigen 1* (LFA-1; CD11a-CD18), CC- Chemokin Rezeptor 7 (CCR7) und dessen Liganden CC- Chemokin Ligand 21 (CCL21) vermittelt (94). Die Expression dieser Moleküle wurde mittels Durchflusszytometrie in Milz- und Lymphknotenzellen von gesunden und sympathektomierten Tieren untersucht.

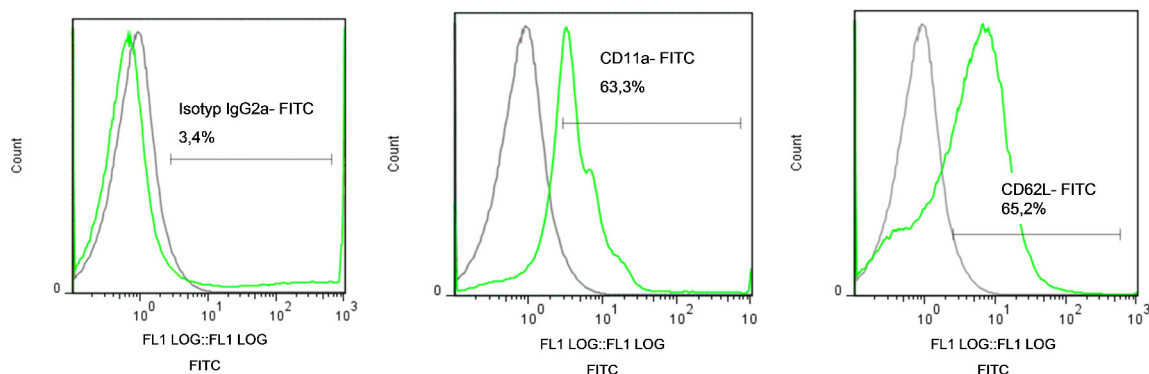


Abbildung 3.21: FACS-Analyse der Zelladhäsionsmoleküle CD62L und CD11a

Gezeigt ist exemplarisch ein Beispiel der Ergebnisse der Färbung von gesunden Milzzellen mit FITC-konjugierten CD62L- und CD11a-Antikörpern, sowie der entsprechenden Isotypkontrolle. Der Farbstoff wurde in Kanal 1 (FL1, FITC) gemessen. Angegeben ist der prozentuale Anteil gefärbter Zellen. Die Überlagerung der Histogramme zeigt die erfolgreiche Färbung der Zellen an. Die Werte der Isotypkontrolle wurden von denen der gefärbten Zellen abgezogen. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mittels Overtone Analyse der FlowJo Software.

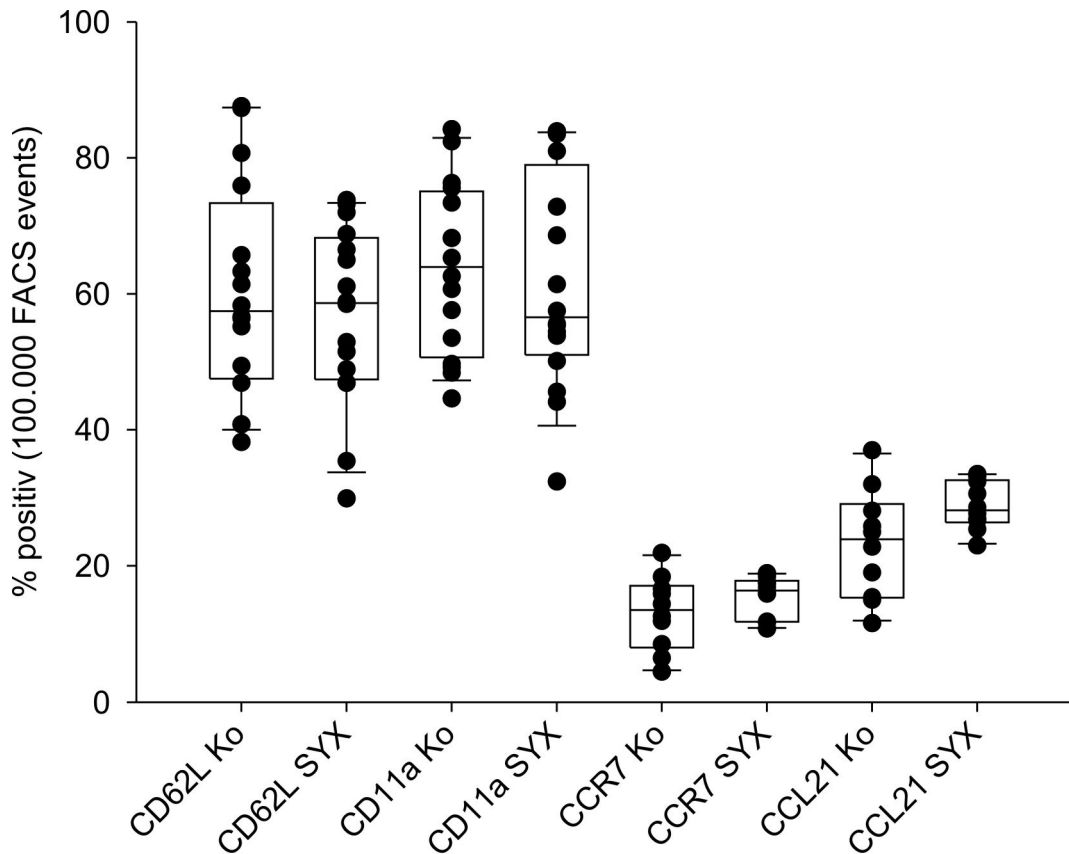


Abbildung 3.22: Sympathektomie hat keinen Einfluss auf CAM Expression von Milzzellen

Milzzellen aus gesunden (Ko) und sympathektomierten (SYX) Tieren wurden isoliert und mittels FACS analysiert. Von jeder Probe wurden 100.000 events gemessen und als positiv prozentualer Anteil dieser dargestellt. Die Daten sind als Box Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile dargestellt. Jeder Punkt entspricht einem untersuchten Organ (n =16 für CD62L und CD11a, n = 10 für CCR7 und CCL21).

In der Milz konnte keine Modulation der Expression von Zelladhäsionsmolekülen durch Sympathektomie festgestellt werden.

Bei der Analyse von Lymphknotenzellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von CCR7 durch Sympathektomie im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant erhöht ist (Abb. 3.23) Die anderen untersuchten Moleküle wiesen keine veränderte Expression durch Sympathektomie auf. Da CCR7 als hauptsächlicher am Einwandern beteiligter Chemokinrezeptor betrachtet wird (124), sollte im folgenden Versuch die Sekretion seines Liganden CCL21 genauer untersucht werden.

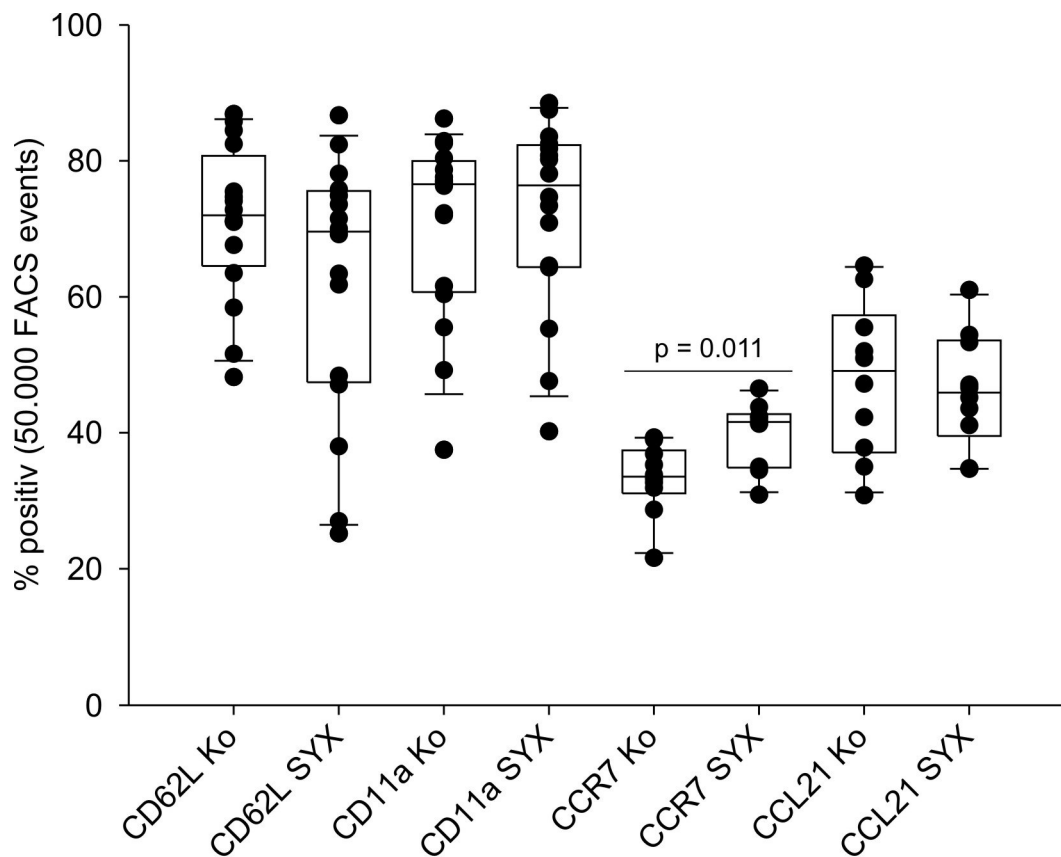


Abbildung 3.23: Sympathektomie beeinflusst die Expression von CCR7 auf Lymphknotenzellen

Lymphknotenzellen aus gesunden (Ko) und sympathektomierten (SYX) Tieren wurden isoliert und mittels FACS analysiert. Von jeder Probe wurden 50.000 events gemessen und als positiv prozentualer Anteil dieser dargestellt. Die Daten sind als Box Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile dargestellt (MWU-Test). Jeder Punkt entspricht einem untersuchten Organ (n =16 für CD62L und CD11a, n = 10 für CCR7 und CCL21).

3.3.1 CCL21 Sekretion in Kultur von Milz- und Lymphknotenzellen

CCL21 wird vornehmlich auf HEVs exprimiert, sowie von Bindegewebszellen in der T-Zellzone von Lymphknoten produziert (94;101;124). Zunächst wurden fünf Millionen Zellen aus gesunden bzw. sympathektomierten Milzen und Lymphknoten 24 h im Brutschrank kultiviert (37 °C, 5 % CO₂). Danach erfolgte die Konzentrationsbestimmung von CCL21 mittels ELISA in Zellkulturüberständen.

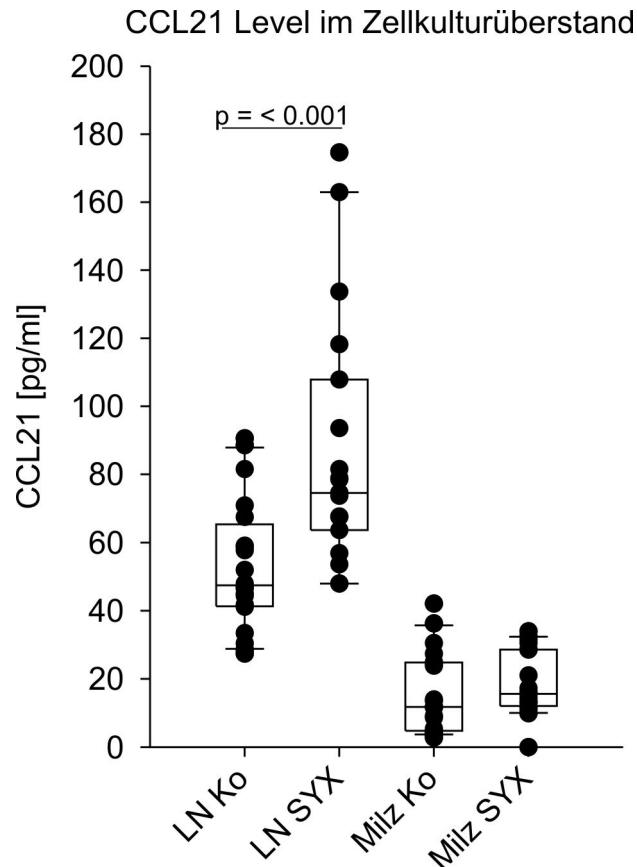


Abbildung 3.24: Sympathektomie steigert die Produktion von CCL21 in Lymphknoten

Gezeigt ist die CCL21 Sekretion nach 24 stündiger Zellkultur von Lymphknoten und Milzzellen aus gesunden (Ko) und sympathektomierten (SYX) Tieren. Pro Organ wurden 5 Mio. Zellen eingesetzt und die Überstände mittels ELISA analysiert (n = 20). Die Daten sind als Box Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile dargestellt (MWU-Test).

Es konnte ein signifikanter Anstieg der CCL21 Konzentration in Überständen von Lymphknotenzellen aus sympathektomierten Tieren im Vergleich zu gesunden Tieren festgestellt werden. In Milzzellüberständen traten keine Unterschiede auf. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das SNS via Modulation der Expression von CCR7 und dem Liganden CCL21 wichtige Eintrittssignale im Lymphknoten inhibiert. Der Eintritt von Zellen in die Milz ist größtenteils unabhängig von Chemokinen (101), weswegen die Effekte dort anderer Natur sein dürften.

3.4 Einfluss der Sympathektomie auf den Egress von Lymphozyten

Während CCR7 und CCL21 entscheidend für das Einwandern von T-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen in die Lymphknoten sind, so ist Sphingosin-1-Phosphat (S1P)

bedeutend für den Egress von Zellen aus den Lymphknoten (104). Um den Einfluss des SNS auf Egresssignale zu untersuchen, wurde die S1P Serumkonzentration gemessen.

3.4.1 Sphingosin-1-Phosphat Level im Serum von Kontrolltieren, arthritischen und sympathektomierten Tieren

An Tag 18 nach Immunisierung wurde Serum von arthritischen, sympathektomiert arthritischen, gesunden und gesunden sympathektomierten DBA1/J Mäusen entnommen und die Proben im ELISA gemessen.

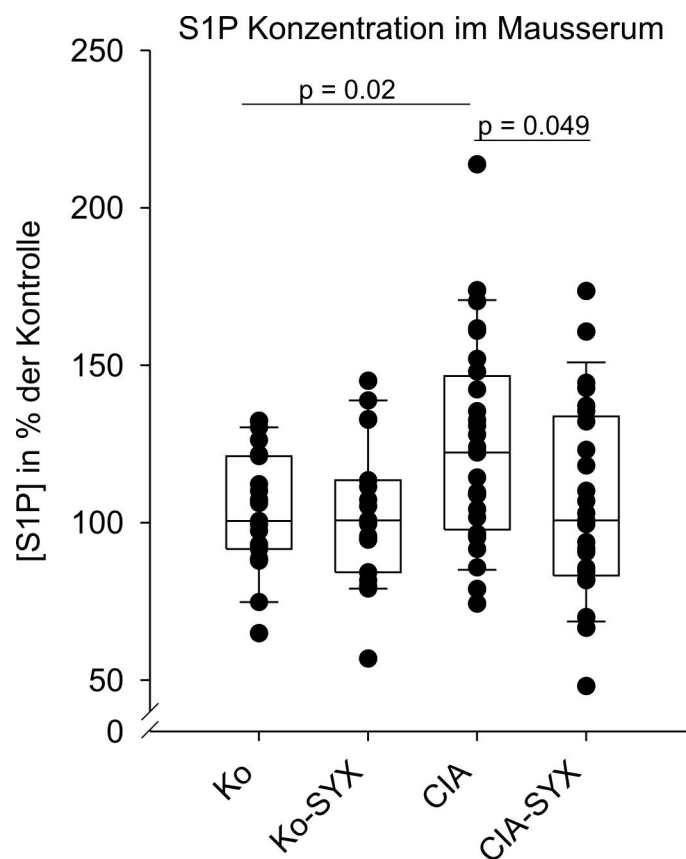


Abbildung 3.25: Modulation der S1P Serumkonzentration durch Sympathektomie

Gezeigt sind die S1P Serumkonzentrationen an Tag 18 nach der Immunisierung. Als Kontrollgruppen dienten gesunde (Ko) und gesunde sympathektomierte (Ko-SYX) DBA1/J Mäuse. Die Serumkonzentration wurde auf die Mittelwerte der jeweiligen Kontrolle bezogen und als Prozent der Kontrolle angegeben. Jeder Punkt entspricht einer Probe eines Tieres (n Ko = 20, n CIA = 28). Die Daten sind als Box Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile dargestellt (MWU-Test).

Arthritische Tiere zeigten einen signifikanten Anstieg der S1P Serumkonzentration verglichen mit gesunden Kontrolltieren. Die Absolutserumkonzentration betrug in Kontrolltieren im Mittel 281 μ M und in arthritischen Tieren 312 μ M. Die Sympathektomie

in arthritischen Tieren erniedrigte die Konzentration auf das Level der Kontrolltiere. Das weist darauf hin, dass das SNS den Egress von Lymphozyten über erhöhte S1P Serumkonzentrationen reguliert. Sympathektomie ohne Arthritis änderte die S1P Konzentration nicht. Es braucht hier also noch einen weiteren Faktor, der nur im Kontext der Arthritis auftritt.

3.5 Einfluss der frühen Sympathektomie auf die Affinitätsreifung Kollagen Typ II spezifischer Antikörper

In diesem Versuch sollte geklärt werden, ob die Retention von Lymphozyten in den Lymphknoten durch Sympathektomie eine bessere Affinitätsreifung der Kollagen Typ II spezifischen Antikörper zur Folge hat. Die Affinitätsreifung findet im Keimzentrum statt, wobei durch somatische Hypermutation und anschließende Selektion auf verbesserte Antigen-Bindungsstärke abgezielt wird (26;125). Sobald die B-Zelle ein Antigen aufgenommen hat, vermehrt sie sich und durchläuft den Vorgang der somatischen Hypermutation (antigenspezifische Bindungsstelle des B-Zellrezeptors, bzw. Oberflächenantikörpers wird nach dem Zufallsprinzip durch ein Enzym verändert). Treffen die B-Zellen dann auf antigenpräsentierende Zellen, wird die Bindungsstärke des mutierten B-Zellrezeptors geprüft. Hat die Mutation die Bindung der Immunglobuline an das Antigen geschwächt, stirbt die B-Zelle durch Apoptose kontrolliert ab. Hat die Mutation die spezifische Bindung an das Antigen gestärkt, so zeigt die B-Zelle dieses Antigen nun auf ihrem MHC-Klasse-II-Komplex einer follikulären T-Helferzelle, die es mit ihrem spezifischen T-Zellrezeptor erkennt. Durch diesen Kontakt wird auch der Klassenwechsel bei den Immunglobulinen ausgelöst, sodass die B-Zelle nun kein IgM, sondern IgG herstellt. Die B-Zelle ist nun zur Immunabwehr geeignet, verlässt das Keimzentrum und entwickelt sich zur Plasmazelle weiter, die spezifische Antikörper sezerniert. Einige B-Zellen reifen zu Gedächtniszellen heran, die dafür sorgen, dass das Immunsystem auf ein späteres erneutes Auftreten desselben Antigens schneller und stärker reagieren kann. Ein anderer Teil der B-Zellen tritt erneut in das Keimzentrum ein, um sich zu vermehren und durch Mutation und Selektion die Antikörperbindungsstärke weiter zu verbessern. So steigert der Organismus die Affinität der Immunglobuline zu einem bestimmten Antigen mit der Zeit. Diesen Vorgang nennt man Affinitätsreifung (26;125). Es wäre denkbar, dass dieser Prozess ebenfalls durch die Sympathektomie begünstigt wird.

3.5.1 Thiocyanat basierte Elution von anti-Kollagen Typ II Antikörpern aus Mausserum

Schon 1986 wurde eine Methode zur Messung der Antikörper-Avidität beschrieben (119), die aus einer Variation eines Standard ELISA entwickelt wurde. Und bis heute angewendet wird (120;121;126). Die in den Kavitäten der ELISA Platte enthaltenen Antikörper sind an das Antigen gebunden und werden steigenden Konzentrationen des chaotropen Thiocyanat-Ions (SCN) ausgesetzt.

Das Aufbrechen der Bindung zwischen dem gebundenen Antigen auf der ELISA Platte (Kollagen Typ II) und dem anti-CII Antikörper in Anwesenheit des SCN gibt Aufschluss über die Antikörperbindungsstärke und kann als Maß für die Avidität angesehen werden. Avidität bezeichnet die Stabilität der multivalenten Antigen-Antikörper Bindung (121). Auf diese Weise könnten Hinweise erhalten werden, ob durch frühe Sympathektomie eine Steigerung der Affinitätsreifung auftritt. Die Konzentration der aCII Antikörper im Serum von arthritischen und sympathektomierten arthritischen Tieren wurde mittels ELISA bestimmt. Gleichzeitig erfolgte von jeder Probe eine schrittweise Elution durch die Zugabe steigender Konzentrationen von NaSCN.

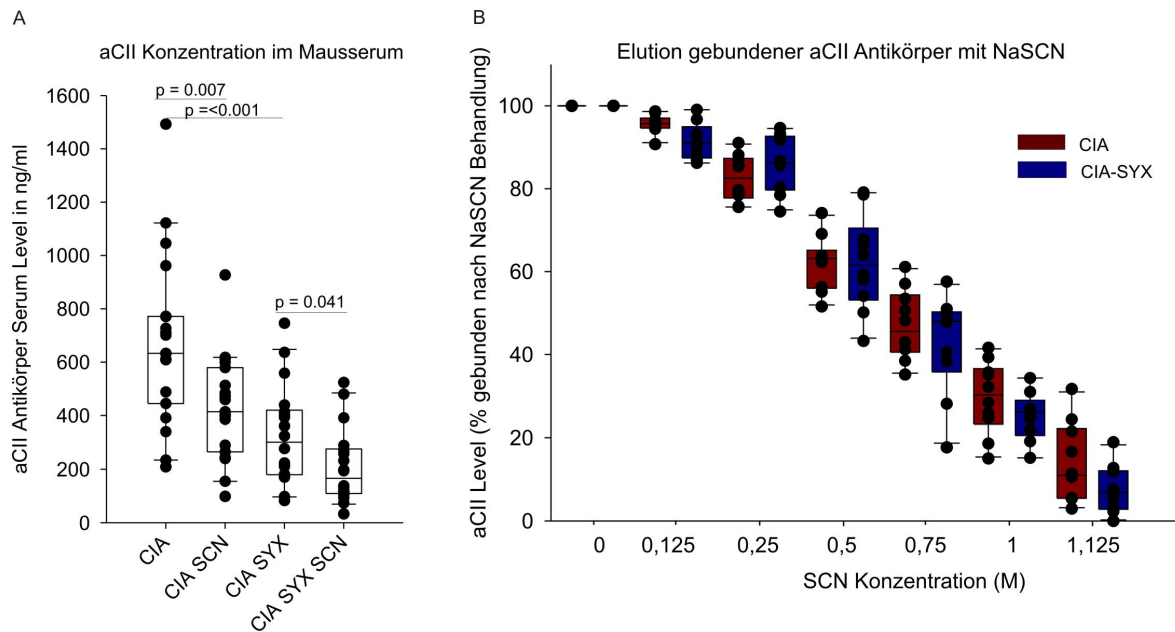


Abbildung 3.26: Elution gebundener aCII Antikörper in Serumproben mittels Thiocyanat

In (A) ist die Antikörperkonzentration im Serum von arthritischen (CIA) und arthritischen sympathektomierten (CIA SYX) DBA1/J Mäusen vor und nach der Behandlung mit 0,5 M NaSCN gezeigt. Das Mausserum wurde an Tag 18 nach Immunisierung entnommen und mittels ELISA analysiert. Jeder Punkt entspricht der Serumprobe eines Tieres ($n = 18$ für CIA SYX und 19 für CIA; Symbole können überlagert sein). Die Daten sind als Box Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentile dargestellt (MWU-Test). In (B) ist die SCN-abhängige prozentuale Abnahme der an die mit Antigen beschichteten ELISA Platte gebundenen aCII Antikörper dargestellt. Es konnten keine Unterschiede zwischen arthritischen und sympathektomierten Tieren festgestellt werden. Für jede SCN Konzentration wurden 10 Serumproben untersucht. Abkürzungen: aCII, anti-Kollagen Typ II Antikörper; CIA, Kollagen induzierte Arthritis; SCN, Thiocyanat-Ion; SYX, Sympathektomie.

Es konnte gezeigt werden, dass die Antikörperkonzentration im Serum von sympathektomierten Mäusen im Vergleich zu arthritischen Mäusen deutlich verringert ist (Abb. 3.26 A). Thiocyanatbehandlung der Proben löst die Antikörperbindung effizient um rund 60 % (600 ng/ml vs. 400 ng/ml in CIA Tieren, bzw. 300 ng/ml vs. 200 ng/ml in sympathektomierten Tieren). Eine Aviditätsänderung durch Sympathektomie konnte nicht festgestellt werden. Es ist denkbar, dass der durch Sympathektomie induzierte erniedrigte aCII-Antikörpertiter im Mausserum zu einer milderen Arthritis beiträgt.

4 Diskussion

4.1 *Spatial Energy Expenditure Configuration* (SEEC)

Im Laufe der vergangenen Jahre haben Berechnungen gezeigt, dass die Aktivierung des Immunsystems sehr kostspielig ist und bis zu 25 % des Grundumsatzes eingefordert werden. Dies ist besonders im Kontext lang andauernder, chronisch entzündlicher Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis von Bedeutung. Es muss eine Bereitstellung energiereicher Substrate im Krankheitsverlauf gewährleistet sein, um das aktivierte Immunsystem zu „nähren“. Die entzündungsbedingte Aktivierung der HPA-Achse und des SNS entfaltet aufgrund der Ausschüttung von Cortisol und Neurotransmittern des SNS (Adrenalin und Noradrenalin) immunsuppressive und antiinflammatorische Wirkungen. Neueste Erkenntnisse zeigen, dass die Aktivierung dieser beiden Systeme gleichermaßen als eine „*Energy Appeal Reaction*“ angesehen werden müssen (27), da es unter deren Einfluss zu einer Energieumverteilung in den Energiesubstratspeichern des Organismus kommt. Freie Fettsäuren aus dem Fettgewebe, Glykogen aus Leber und Muskel versorgen als energiereiche Substrate das aktivierte Immunsystem. Diese *Energy Appeal Reaction* tritt sowohl bei kurz andauernden Infektionen, als auch im Kontext chronisch entzündlicher Erkrankungen auf. Sauerstoffmessungen als Maß des Energieverbrauchs sind schon lange bekannt (127). Der Energieverbrauch in verschiedenen Organen während des Krankheitsverlaufs der experimentellen Arthritis wurde bisher noch nicht untersucht. In diesem Abschnitt sollten Organe mit hohem Energiebedarf, die in der initialen Phase und an der Aufrechterhaltung der Krankheit beteiligt sind, identifiziert werden und unter verschiedenen Bedingungen getestet werden. Mit der Etablierung der SEEC Methode ist dies gelungen.

In ersten Experimenten wurde der Sauerstoffverbrauch von DBA1/J Mäusen in verschiedenen Organen im Krankheitsverlauf mit gesunden Kontrolltieren verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die sekundären lymphatischen Organe wie Milz und drainierende Lymphknoten im Vergleich zu gesunden Tieren im gesamten Organ mehr Sauerstoff verbrauchen. Die anderen getesteten Organe zeigten keinen erhöhten Energiebedarf. Lediglich in der Leber und der Niere wurde eine Abnahme des Sauerstoffverbrauchs beobachtet. Mögliche Ursachen dafür müssten durch weitere Analysen der einzelnen Stoffwechselwege (z. B. Gluconeogenese) geklärt werden. Die Hypothese, dass der Energieverbrauch in sympathektomierten Tieren erniedrigt ist, konnte

nicht bestätigt werden. Da frühere Untersuchungen gezeigt haben, dass die Sympathektomie vor Immunisierung zu einer Milderung des Arthritis Scores führt (59), wurde erwartet, dass dadurch auch ein erniedrigter Energiebedarf in verschiedenen Organen in diesen Tieren vorherrscht, da auch die β 2-induzierte Lipolyse in den Tieren nicht stattfinden kann. Im Gegensatz zu dieser Annahme war der Sauerstoffverbrauch in Milz und Lymphknoten in sympathektomierten Kontrolltieren und sympathektomiert arthritischen Tieren drastisch erhöht (im Lymphknoten um 200 %). Eine Verbesserung des klinischen Arthritis Scores konnte bestätigt werden. Man kann an dieser Stelle festhalten, dass das SNS einen proinflammatorischen Einfluss in der frühen Immunisierungsphase der Arthritis ausübt, in der späten Phase antiinflammatorische Wirkung zeigt (59). Die Gründe dafür sind jedoch nur zum Teil bekannt. Ähnliche antiinflammatorische Einflüsse der frühen Sympathektomie wurden auch von anderen Arbeitsgruppen demonstriert, jedoch wurden die Mäuse nicht lange genug nach dem Abklingen der Sympathektomie beobachtet, um einen späteren Krankheitsschub feststellen zu können (60;122;128).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen auch erhöhte Organgewichte von Milz und Lymphknoten in sympathektomierten Tieren verglichen mit Kontrolltieren, was zu einer neuen Hypothese führte. Da ein massiver Anstieg des Sauerstoffverbrauchs und der Organgewichte selbst in gesunden, sympathektomierten Mäusen auftrat, wurde vermutet, dass das SNS für die Freisetzung von Lymphozyten aus den sekundären lymphatischen Organen verantwortlich ist. Das Ausschalten des SNS durch Sympathektomie führt demnach zu einer Retention von Lymphozyten in Milz und Lymphknoten, hält die immunkompetenten Zellen vom Entzündungsgeschehen fern und mildert auf diese Weise die experimentelle Arthritis. Diese Hypothese sollte zu einem späteren Zeitpunkt überprüft werden. Mithilfe der SEEC-Methode wurden des Weiteren Mäuse des heterozygoten *Atgl*-KO Phänotyps (*Atgl*^{+/-}) untersucht. Als Kontrollgruppe dienten Wildtyp C57BL/6 Mäuse. Zunächst konnte beobachtet werden, dass beide Gruppen relativ wenig krank wurden und keine Unterschiede im Arthritis-Schweregrad festgestellt werden konnten. Der Arthritis Score betrug rund 10 Punkte, was im Vergleich mit DBA1/J Mäusen bei einem höchsten Score von rund 25 Punkten als gering anzusehen ist.

Trotzdem konnte eine deutliche Zunahme des Sauerstoffverbrauchs in den Lymphknoten von WT und *Atgl*^{+/-} Tieren festgestellt werden. Der Sauerstoffverbrauch im Herz war unabhängig von der Krankheit in *Atgl*^{+/-} Mäusen erniedrigt. Eine mögliche Erklärung ist die eingeschränkte Energiebereitstellung im Herzen dieser Tiere, da homozygote KO-Tiere durch Herzverfettung eine geminderte Lebenserwartung aufweisen (66). Eine

Einschränkung der Respiration in heterozygoten Tieren ist denkbar. Der höhere O₂-Verbrauch in Leber und Niere könnte durch gesteigerte Gluconeogenese auftreten, da die Lipolyse eingeschränkt abläuft und durch gesteigerte Gluconeogenese die nötige Bereitstellung energiereicher Substrate ausgleicht. Dies traf auch auf den Sauerstoffverbrauch der kranken *Atgl^{+/-}* Leber zu, was eine weitere Steigerung der Gluconeogenese durch Krankheit bedeuten könnte. Im nicht fastendem Zustand findet 80 - 90 % der Gluconeogenese in der Leber statt, während die Niere für 10 – 20 % dieses Prozesses verantwortlich ist. Unter hungernden Bedingungen steigt der Anteil der Gluconeogenese der Niere auf 40 - 50 % an (129;130). Um genauere Anhaltspunkte zu erhalten, könnte in Zukunft die Expression der Gluconeogenese-Enzyme Glucose-6-Phosphatase oder Phosphoenolpyruvatkinase in Leber und Niere dieser Tiere untersucht werden. Der Darm scheint in C57BL/6 Mäusen ebenfalls beträchtlich an der Immunreaktion beteiligt zu sein, da ein höherer Energieverbrauch in kranken Tieren beider Gruppen beobachtet wurde. Interessant ist, dass bei DBA1/J Mäusen keine Unterschiede des Sauerstoffverbrauchs zwischen kranken und gesunden Tieren im Darm auftraten. Es handelt sich wahrscheinlich um Mausstamm-spezifische Unterschiede. Es wäre anzunehmen dass eine Keimfreiheit eine Milderung der Arthritis in C57BL/6 Tieren begünstigt.

Ein weiterer Unterschied, der in C57BL/6, aber nicht in DBA1/J Mäusen auffiel, ist der gesteigerte Sauerstoffverbrauch der Nebennieren in kranken Tieren beider Gruppen, wohingegen in DBA/1J Mäusen keine Unterschiede auftraten. Eine gesteigerte Steroidogenese in den Nebennieren von kranken Tieren wäre an dieser Stelle denkbar.

Im letzten Versuchblock der SEEC-Messungen sollte eine mögliche Therapie der CIA bezüglich einer Energieumverteilung mittels Icilin getestet werden. Icilin induziert ein Gefühl von Kälte in den Tieren, was zu einer starken Energieumverteilungsreaktion führen sollte, da die Energie der Tiere dem Immunsystem zur Wärmeproduktion abgeführt wird. Die Tiere wurden eine Woche lang morgens und abends um den Immunisierungszeitpunkt behandelt und bis Tag 40 beobachtet, bevor abschließend die Sauerstoffverbrauchsmessungen durchgeführt wurden. Die Icilin behandelte Gruppe wies einen deutlich geringen Arthritis-Schweregrad auf als die Kontrollgruppe, was einen therapeutischen Effekt der Energieumverteilung bestätigt. Am Tag 40 nach der Immunisierung waren keine Unterschiede des Energiebedarfs in Milz oder Lymphknoten detektierbar. Auch andere Organe wie Herz, Leber, Niere und Darm zeigten keine Änderungen des Energiebedarfs. Es ist anzunehmen, dass die Sauerstoffmessungen in

diesem Versuch zu spät durchgeführt wurden. Die Messungen des ersten Versuchsblocks haben gezeigt, dass der Sauerstoffverbrauch schon 6 Stunden nach der Immunisierung in Milz und Lymphknoten deutlich ansteigt. Um einen besseren Einblick zu erhalten, müssten die Experimente wiederholt werden und der Sauerstoffverbrauch zu einem früheren Zeitpunkt gemessen werden (Tag 5 und Tag 14 nach der Immunisierung). Lediglich im Gehirn konnte ein Anstieg des Sauerstoffverbrauchs in der Icilin Gruppe verglichen mit der Vehikel Gruppe festgestellt werden, wohingegen der Verbrauch in der Nebenniere abnahm.

Die SEEC-Methode konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich etabliert werden und kann auf andere Tiermodelle angewendet werden.

4.2 Einfluss des sympathischen Nervensystems auf das Homing von Immunzellen

Es ist seit Jahren bekannt, dass das sympathische Nervensystem die Anzahl zirkulierender Blutzellen beeinflusst (131;132). Auch bei nicht entzündlichen Erkrankungen wie Herzinfarkt oder Lungenembolie kann es unter stressreichen Bedingungen, wie z. B dem Besuch der Notaufnahme, zu einer Leukozytose kommen. Der SNS-gesteuerte Anstieg zirkulierender Leukozyten wurde kürzlich zusammenfassend dargestellt (133) und unterliegt einem zirkadianen Rhythmus (134).

In ersten Experimenten wurde der Eintritt *ex vivo* gefärbter Zellen in die lymphatischen Organe Milz und Lymphknoten in gesunden und sympathektomierten Tieren untersucht. Es konnte eine erhöhte Präsenz von gefärbten Lymphknotenzellen in Lymphknoten und Milzen sympathektomierter Tiere verglichen mit gesunden Kontrolltieren beobachtet werden. Dasselbe traf auf gefärbte Milzzellen zu, welche zu höherer Anzahl in Milzen von sympathektomierten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren gefunden wurden. Dieses Ergebnis lieferte den ersten Anhaltspunkt, dass das SNS für eine Blockade von Eintrittssignalen bzw. erhöhten Egress gefärbter Zellen verantwortlich ist. Das beobachtete Phänomen, dass Lymphknoten- bzw. Milzzellen präferenziell an den Ort ihrer Herkunft zurückwandern, ist in der Literatur beschrieben (135;136).

Das Homing in und der Egress aus sekundären lymphatischen Organen ist von wichtigen Schlüsselmolekülen wie CCR7 / CCL21 (Eintritt) und S1P / S1P1 (Egress) abhängig (Abbildung 4.1). CCR7 wird hauptsächlich auf T-Zellen und dendritischen Zellen, z. T. auch auf B-Zellen exprimiert und bindet seine Liganden CCL19 und CCL21, die von

Blutgefäßen der Venolen mit hohem Endothel und retikulären Fibroblasten der T- Zellzone exprimiert werden (101). Es konnte eine erhöhte Expression von CCR7 auf Lymphozyten sympathektomierter Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet werden. Zusätzlich war das CCL21 Level in Zellkulturüberständen von Lymphknotenzellen sympathektomierter Mäuse im Vergleich zu gesunden Zellen erhöht. Dieser Befund dürfte zu einer erhöhten Homing-Rate von T-, B-, und dendritischen Zellen in die Lymphknoten sympathektomierter Tiere beitragen. Der essentielle Mediator des Zellegress aus Lymphknoten ist das Sphingosin-1-Phosphat, welches von Endothelzellen in das Gefäßlumen sezerniert wird. Da die Konzentration von S1P im Gewebe 100-fach geringer ist als im Serum, wird innerhalb der Lymphknotenarchitektur ein S1P-Gradient erzeugt, an dem die S1P1-Rezeptor exprimierenden Leukozyten das Gefäßlumen ansteuern und aus den Lymphknoten auswandern (Abb. 4.1) (101;104). Es wurde beschrieben, dass CCR7 dem S1P-Egresssignal entgegenwirkt und Zellen in den sekundären lymphatischen Organen zurückhält (118;124). In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Sympathektomie die S1P Serumkonzentration auf Kontrollevel reduziert. Das SNS hatte unter Kontrollbedingungen (gesund und gesund sympathektomierten Tieren) keinen Einfluss, was die Vermutung nahe legt, dass ein zusätzlicher Pfad nur in arthritischen Tieren angeschaltet wird, der das S1P Serumniveau reguliert. Die Vermutung, dass durch die Retention der Zellen in Lymphknoten sympathektomierter Tiere eine gesteigerte Affinitätsreifung der anti-Kollagen Typ II Antikörper erfolgt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

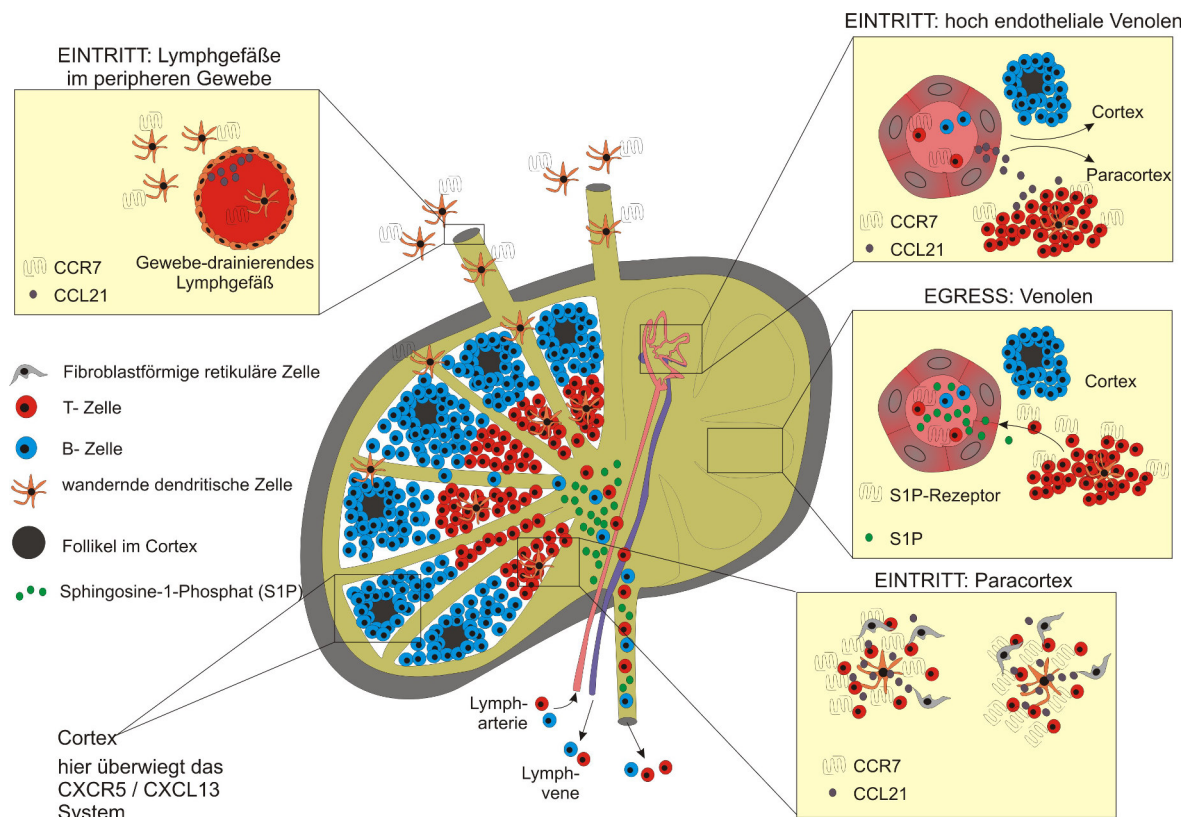


Abbildung 4.1: Ein- und Auswandern von Lymphozyten in und aus den Lymphknoten

Der Eintritt von Leukozyten findet sowohl über periphere Lymphgefäße (links oben) als auch über hoch endotheliale Venolen statt (rechts oben). In beiden Fällen ist das CCR7-CCL21 Rezeptor-Ligandenpaar nötig. Innerhalb des Lymphknotens erfolgt die Migration der B-Zellen in den Cortex (oben rechts) sowie das Homing von T-Zellen Richtung Paracortex (unten rechts) ebenfalls in Abhängigkeit der CCR7-CCL21 Interaktion. In der B-Zellzone überwiegt das Zusammenspiel von CXCR5 und CXCL13. Für den Egress von Leukozyten wird ein Sphingosin-1-Phosphat Gradient benötigt, der im Innern des Lymphknotens niedrig und im Gebiet der Austrittsstellen (lymphatischen Venen und efferente Lymphgefäße) hoch ist (rechts mittig). Abkürzungen: CCL21, Chemokin (C-C) Ligand 21; CCR7, Chemokin (C-C) Rezeptor 7; CXCL13, Chemokin (C-X-C) Ligand; CXCR5, Chemokin (C-X-C) Rezeptor 5.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mittels SEEC-Technik die sekundären lymphatischen Organe Milz und Lymphknoten als Zielorgane des SNS identifiziert wurden. Die Ergebnisse der Arbeit unterstreichen die Vorstellung, dass die Milderung der experimentellen Arthritis durch frühe Sympathektomie aufgrund einer Retention von Leukozyten in Lymphknoten eintritt. Dieser Einfluss könnte die Rezirkulation aktivierter und antigenspezifischer Immunzellen zu den Orten des Entzündungsgeschehens verhindern und somit heilsam sein. Dieses Prinzip der blockierten Rezirkulation immunkompetenter Zellen findet mit der Behandlung der multiplen Sklerose mittels Fingolimod (FTY720) bereits Anwendung (113;114). FTY720 ist ein hoch affiner Agonist an S1P1-Rezeptoren. Die Bindung von FTY720 verursacht eine Internalisierung dieser Rezeptoren und auf diese Weise werden die Zellen in sekundären lymphatischen Organen zurückgehalten (112;137). In Human-Studien konnte gezeigt werden, dass die zirkulierenden Lymphozyten im Blut

nach zweiwöchiger FTY720 Einnahme (0,5 mg/Tag) drastisch reduziert waren (114). Im Tiermodell der Arthritis konnte beobachtet werden, dass eine FTY720 Behandlung den Arthritis Score, die Inzidenz, sowie die Schwellung der Pfoten besserte (137). Möglicherweise gibt es hier Parallelen zur Modulation des Zellegress durch frühe Sympathektomie.

In dieser Arbeit konnte außerdem bestätigt werden, dass die Abzweigung nötiger Energie vom aktivierten Immunsystem durch Auslösen einer Energieumverteilung den Krankheitsverlauf mildert. Das verdeutlicht, dass die Energieregulation während der Entzündung von großer Bedeutung ist. Auf dieser Grundlage könnten neue Therapiemöglichkeiten entwickelt werden. Genaue Mechanismen müssen noch untersucht werden. Es ist aber anzunehmen, dass Icilin nicht nur durch das Auslösen der Energieumverteilung, sondern durch weitere antiinflammatorische molekulare Mechanismen wirkt, wie es im Fall der Kolitis bereits demonstriert wurde (138).

5 Zusammenfassung

Die Aktivierung des Immunsystems im Kontext chronisch entzündlicher Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis ist energetisch betrachtet sehr kostspielig. Berechnungen haben gezeigt, dass das aktivierte Immunsystem einen geschätzten Energiebedarf von 2000-2200 kJ hat, was ca. 25 % des Grundumsatzes ausmacht. Dies beweist, dass die Energiebereitstellung genauestens reguliert werden muss, um Entzündungsreaktionen zu „nähren“ und Reparaturprozesse aufrecht zu erhalten (27). Die systemische Energieregulation dient der Speicherung energiereicher Substrate. Während der Inflammation muss eine Energieumverteilungsreaktion stattfinden, um das aktivierte Immunsystem zu unterstützen („*Energy appeal reaction*“). Der wichtigste Aspekt der zellulären Energieregulation ist die ATP-Synthese. Diese erfolgt über die Hauptstoffwechselwege der Glykolyse, Proteolyse und β -Oxidation von Fettsäuren. Der Energieverbrauch und damit die ATP-Synthese kann über Messungen des Sauerstoffverbrauchs realisiert werden. Der Energieverbrauch in einzelnen Organen zu verschiedenen Zeitpunkten wurde im Krankheitsverlauf der Arthritis bisher noch nicht untersucht und sollte im ersten Teil dieser Arbeit bestimmt werden. Dazu wurde eine neue Methode entwickelt („SEEC - *spatial energy expenditure configuration*“), die Organe mit gesteigertem Energiebedarf identifizieren sollte. Diese basiert auf der *in vitro* Messung des Sauerstoffverbrauchs in verschiedenen Organen und wurde bei gesunden, arthritischen und sympathektomierten DBA1/J Mäusen angewendet. Der Sauerstoffverbrauch wurde in Milz, Thymus, drainierenden Lymphknoten, Herz, Nebennieren, Leber, Niere, Gehirn, Darm, Schilddrüse und im umgebenden Fettgewebe der Lymphknoten im Verlauf der experimentellen Arthritis bis Tag 55 bestimmt. In arthritischen Lymphknoten und Milzen wurde ein deutlicher Anstieg des Sauerstoffverbrauchs, sowie der Organgewichte verglichen mit Kontrolltieren festgestellt. Obwohl die frühe Sympathektomie (SYX) die Arthritis milderte, konnte ein Anstieg des Sauerstoffverbrauchs und der Zellzahl beobachtet werden. Dies traf auch auf gesunde sympathektomierte Tiere zu und wurde als Zeichen der Retention von Lymphozyten in lymphatischen Organen bei arthritischen und gesunden sympathektomierten Tieren interpretiert. Andere untersuchte Organe wie Leber und Niere wiesen einen verminderten Sauerstoffverbrauch in arthritischen Tieren im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren auf.

Die SEEC-Methode wurde außerdem angewendet, um den Sauerstoffverbrauch im Verlauf der Arthritis von ATGL (Adipozyten Triglycerid Lipase)-defizienten Tieren im Vergleich

zu Wildtyp Tieren (C57BL/6) zu untersuchen. In diesen Tieren konnte ein gesteigerter Sauerstoffverbrauch in Leber und Niere festgestellt werden. Es ist anzunehmen, dass durch verminderte Lipolyse Aktivität eine gesteigerte Gluconeogenese Aktivität in Leber und Niere auftritt. Weiterhin konnte ein erhöhter Sauerstoffverbrauch in Lymphknoten, Nebennieren und im Darm beobachtet werden. Das Herz zeigte einen verminderten Sauerstoffverbrauch, was mit Beobachtungen von Rudolf Zechner übereinstimmt, der gezeigt hat, dass die übermäßige Fettakkumulation im Herzen ATGL-defizienter Tiere dessen Funktion beeinträchtigt und zu einem frühzeitigen Tod der Tiere führt (65;66).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte des Weiteren gezeigt werden, dass eine Icilin Behandlung eine starke, durch Kältezittern hervorgerufene, Energieumverteilungsreaktion in DBA1/J Mäusen auslöst. Icilin induziert ein Gefühl von Kälte sowie starkes Zittern in den Tieren und die Energie geht für Wärmeproduktion verloren. Icilin behandelte Tiere entwickelten eine signifikant mildere Arthritis als unbehandelte Kontrolltiere, was die Bedeutung der Energieregulation bei chronisch entzündlichen Erkrankungen unterstreicht.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie das sympathische Nervensystem (SNS) das Migrationsverhalten von Lymphozyten und Milzzellen beeinflusst. Hier sollte sowohl das Einwandern von Zellen als auch der Egress aus lymphatischen Organen untersucht werden. Im Modell der Kollagen Typ II-induzierten Arthritis (CIA) ist die frühe Aktivierung des SNS proinflammatorisch, während sie im späteren Stadium antiinflammatorisch wirkt. Frühe Sympathektomie (SYX) vor Immunisierung der Tiere mildert die Arthritis, die genauen Mechanismen sind aber noch nicht geklärt (59). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Einwandern von Milzzellen in die Milz, sowie das Einwandern von Lymphozyten in die Lymphknoten in sympathektomierten Mäusen verglichen mit gesunden Kontrolltieren gesteigert war. Nach früher SYX konnte eine erhöhte Expression von CCR7 auf Lymphozyten und ein gesteigertes CCL21 Level in Zellkulturüberständen von Lymphknotenzellen festgestellt werden. Das trägt wahrscheinlich zu einer Retention von T-Zellen und dendritischen Zellen innerhalb der Lymphknoten bei. Der Egress von Lymphozyten benötigt einen Sphingosin-1-Phosphat (S1P) Gradienten, der im Lymphknotenparenchym hoch und an der Austrittsstelle zum Lumen hin gering ist. Die Messung von S1P im Mausserum ergab eine signifikant höhere Serumkonzentration in CIA Tieren verglichen mit Kontrolltieren. Die frühe SYX erniedrigte die S1P Konzentration in arthritischen Tieren auf das Kontrollevel. Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Etablierung der SEEC-Methode die Identifikation von Organen im Krankheitsverlauf der experimentellen Arthritis ermöglicht

hat, die einen hohen Energiebedarf aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die drainierenden Lymphknoten als Zielorgan des sympathischen Nervensystems bestimmt werden. Die SYX-induzierte Milderung der Arthritis wird wahrscheinlich durch die Retention von Lymphozyten in sekundären lymphatischen Organen hervorgerufen. Das könnte die Rezirkulation von Immunzellen zum Ort des Entzündungsgeschehens verhindern und auf diese Weise zur Verbesserung des Arthritis-Schweregrades beitragen.

6 Summary

An autoimmune response with differentiation and proliferation of clonal immune cells and the subsequent tissue-directed inflammatory process in the clinically symptomatic phase of the disease are very energy-demanding. As recent calculations demonstrate, the activated immune system needs approximately 2000 – 2200 kJ/day, which means 25 % of the basal metabolic rate. Thus, energy regulation and cellular bioenergetics are of outstanding importance to serve a stimulated immune system.

Systemic energy regulation serves the storage of energy-rich fuels. During inflammation, particularly during the chronic process of inflammation in long standing inflammatory diseases like rheumatoid arthritis, a reallocation of energy-rich fuels to the activated immune system is necessary in order to nourish the inflammatory process (“Energy appeal reaction”) (27). The most important aspect of cellular bioenergetics in inflammation is generation of ATP, using the basic energy-rich substrates glucose, proteins and fatty acids. Energy consumption, and, thus, ATP generation can be measured by studying the consumption of oxygen. However, energy expenditure in different organs at different time points has never been investigated during immunization (the asymptomatic phase of the disease) or apparent inflammation (the symptomatic phase of the disease).

A new technique termed “spatial energy expenditure configuration (SEEC)” was developed to demonstrate bodily areas of high energy demand. SEEC is based on the removal of tissue during the course of arthritis, and subsequent determination of oxygen consumption *in vitro*. SEEC was established in healthy control animals, arthritic animals and animals that underwent prior sympathectomy. The model of type II collagen arthritis in DBA1/J mice was used in order to develop an arthritic-specific SEEC. The oxygen consumption in spleen, thymus, draining lymph nodes, heart, adrenals, liver, kidney, brain, gut, thyroid gland and in surrounding fat tissue of draining lymph nodes was determined during the course of experimental arthritis for 55 days.

In draining lymph nodes and spleens of arthritic mice, a marked increase in oxygen consumption and organ weight during the course of arthritis was observed. Although early SYX ameliorated later CIA, early SYX increased energy consumption and cell numbers in arthritic but also in control lymph nodes. This was interpreted as a probable sign of lymphocyte retention in lymphoid organs in healthy and arthritic animals. Other investigated organs like liver or kidney decreased their oxygen consumption (control vs. arthritic animals).

The SEEC technique was further applied to investigate the oxygen consumption during the course of arthritis in ATGL (Adipose triglyceride lipase)-deficient animals and compared to wildtype animals. C57BL/6 mice deficient for this important lipase revealed increased oxygen consumption in the liver and kidney. This might be due to a lack of lipolysis activity, and therefore increased gluconeogenic activity in the liver for the generation of energy rich fuels in form of glucose. ATGL-deficient arthritic animals also showed higher energy demand in lymph nodes, adrenals and gut. The oxygen consumption in the heart of these animals was lower, which goes in line with observations from Rudolf Zechner, who showed that the excessive cardiac lipid accumulation impairs heart function and leads to a premature death in these animals (65;66).

In the context of this work it could further be demonstrated that treatment of animals with Icilin leads to a strong energy reallocation. Icilin induces a feeling of cold and strong shivering behaviour in mice and energy is lost for heat production. Icilin treated animals developed a significantly less severe arthritis than control animals, which underlines the importance of energy regulation in chronic inflammatory diseases.

The aim of the second part of this work was to determine how the SNS influences homing behaviour of lymphocytes in lymph nodes / spleen and, in parallel, egress of lymphocytes from draining lymph nodes / spleen of control and arthritic animals, since the sympathetic nervous system (SNS) plays an important role in course and development of autoimmune diseases like arthritis. In type II collagen- induced arthritis (CIA), early activation of the SNS is proinflammatory, but the SNS is antiinflammatory in later stages of the disease. Early sympathectomy (SYX) prior to immunization ameliorates disease severity, but beneficial mechanisms of early SYX are not completely understood (59). Splenocyte migration to the spleen and lymphocyte migration to lymph nodes were enhanced in early SYX compared to control mice. After early SYX, an elevated expression of CCR7 on lymph node cells and a higher level of CCL21 in lymphocyte cell culture supernatants could be observed. This probably contributes to retention of T cells and dendritic cells within lymph nodes. Egress of lymphocytes requires an Sphingosine-1-phosphate (S1P) gradient, low in the lymph node parenchyma and high at the exit site in the vascular lumen. The measurement of S1P in mouse serum revealed a significant higher concentration in CIA animals when compared to controls. Importantly, early SYX decreased S1P concentration in arthritic animals to control levels.

By using the SEEC technique, locations of high energy demand that are involved in the initiation and continuation of the autoimmune process in an animal model of arthritis were

identified. In this work it could be demonstrated that the draining lymph nodes are a target organ of the sympathetic nervous system. SYX-induced disease amelioration is probably exerted by sequestration of lymphocytes in secondary lymphoid organs. This might prevent recirculation of immune cells to peripheral sites of inflammation and thereby ameliorate the disease.

7 Literatur

1. Müller-Ladner U, Gay S. Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis. In: Straub RH, (Hrsg.). Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 2: Spezielle Pathophysiologie. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht; 2007. 70-79.
2. Pincus T, Callahan LF. What is the natural history of rheumatoid arthritis? *Rheum Dis Clin North Am* 1993; 19:123-51.
3. Goodson N, Symmons D. Rheumatoid arthritis in women: still associated with an increased mortality. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:955-6.
4. Reginster JY. The prevalence and burden of arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41:3-6.
5. Imboden JB. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annu Rev Pathol* 2009; 4:417-34.
6. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30:1205-13.
7. McMichael AJ, Sasazuki T, McDevitt HO, Payne RO. Increased frequency of HLA-Cw3 and HLA-Dw4 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1977; 20:1037-42.
8. Roudier J, Petersen J, Rhodes GH, Luka J, Carson DA. Susceptibility to rheumatoid arthritis maps to a T-cell epitope shared by the HLA-Dw4 DR beta-1 chain and the Epstein-Barr virus glycoprotein gp110. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:5104-8.
9. Carty SM, Snowden N, Silman AJ. Should infection still be considered as the most likely triggering factor for rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 2004; 63:ii46-ii49.

10. Leirisalo-Repo M. Early arthritis and infection. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17:433-9.
11. Albano SA, Santana-Sahagun E, Weisman MH. Cigarette smoking and rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2001; 31:146-59.
12. Straub RH, Dhabhar FS, Bijlsma JW, Cutolo M. How psychological stress via hormones and nerve fibers may exacerbate rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52:16-26.
13. Symmons DP, Bankhead CR, Harrison BJ, Brennan P, Barrett EM, Scott DG et al. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1955-61.
14. Quinn MA, Emery P. Are early arthritis clinics necessary? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005; 19:1-17.
15. Kvien TK, Scherer HU, Burmester GR. Rheumatoid arthritis. In: Bijlsma, JWJ (Hrsg.). *Eular Compendium on Rheumatic Diseases*. First Edition. BMJ Publishing Group Ltd; 2009. 61-67.
16. Visser H. Early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005; 19:55-72.
17. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996; 85:307-10.
18. Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48:2741-9.
19. Neumann E, Gay RE, Gay S, Müller-Ladner U. Functional genomics of fibroblasts. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16:238-45.

-
20. Tarner IH, Härle P, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S. The different stages of synovitis: acute vs. chronic, early vs. late and non-erosive vs. erosive. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005; 19:19-35.
 21. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011; 365:22015-19.
 22. Pap T, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000; 2:361-7.
 23. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007; 13:139-45.
 24. Härle P, Cutolo M, Schölmerich J, Straub RH. Rheumatoid arthritis - pathogenetic role of neuroendocrine axes and the peripheral nervous system. *Med Klin (Munich)* 2002; 97:720-9.
 25. Straub RH, Günzler C, Miller LE, Cutolo M, Schölmerich J, Schill S. Anti-inflammatory cooperativity of corticosteroids and norepinephrine in rheumatoid arthritis synovial tissue in vivo and in vitro. *FASEB J* 2002; 16:993-1000.
 26. Schütt C, Bröcker B. *Grundwissen der Immunologie*. 1. Auflage; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2006.
 27. Straub RH, Cutolo M, Buttgereit F, Pongratz G. Energy regulation and neuroendocrine-immune control in chronic inflammatory diseases. *J Intern Med* 2010; 267:543 -60.
 28. Bendele A. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2001; 1:377-85.
 29. Hegen M, Keith JC, Jr., Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:1505-15.

-
30. Kyburz D, Corr M. The KRN mouse model of inflammatory arthritis. Springer Semin Immunopathol 2003; 25:79-90.
 31. Li P, Schwarz EM. The TNF-alpha transgenic mouse model of inflammatory arthritis. Springer Semin Immunopathol 2003; 25:19-33.
 32. DeJoy SQ, Ferguson KM, Sapp TM, Zabriskie JB, Oronsky AL, Kerwar SS. Streptococcal cell wall arthritis. Passive transfer of disease with a T cell line and crossreactivity of streptococcal cell wall antigens with Mycobacterium tuberculosis. J Exp Med 1989; 170:369-82.
 33. Glenn EM, Gray J. Adjuvant-induced polyarthritis in rats: biologic and histologic background. Am J Vet Res 1965; 26:1180-94.
 34. Brand DD, Kang AH, Rosloniec EF. Immunopathogenesis of collagen arthritis. Springer Semin Immunopathol 2003; 25:3-18.
 35. Holmdahl R, Andersson ME, Goldschmidt TJ, Jansson L, Karlsson M, Malmstrom V et al. Collagen induced arthritis as an experimental model for rheumatoid arthritis. Immunogenetics, pathogenesis and autoimmunity. APMIS 1989; 97:575-84.
 36. Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Collagen-induced arthritis in mice. Methods Mol Biol 2010; 602:181-92.
 37. Nandakumar KS, Holmdahl R. Efficient promotion of collagen antibody induced arthritis (CAIA) using four monoclonal antibodies specific for the major epitopes recognized in both collagen induced arthritis and rheumatoid arthritis. J Immunol Methods 2005; 304:126-36.
 38. Seki N, Sudo Y, Yoshioka T, Sugihara S, Fujitsu T, Sakuma S et al. Type II collagen-induced murine arthritis. I. Induction and perpetuation of arthritis require synergy between humoral and cell-mediated immunity. J Immunol 1988; 140:1477-84.

-
39. Hietala MA, Jonsson IM, Tarkowski A, Kleinau S, Pekna M. Complement deficiency ameliorates collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol* 2002; 169:454-9.
 40. Wang Y, Kristan J, Hao L, Lenkoski CS, Shen Y, Matis LA. A role for complement in antibody-mediated inflammation: C5-deficient DBA/1 mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J Immunol* 2000; 164:4340-7.
 41. Williams RO. Rodent models of arthritis: relevance for human disease. *Clin Exp Immunol* 1998; 114:330-2.
 42. Bendele A, McComb J, Gould T, McAbee T, Sennello G, Chlipala E et al. Animal models of arthritis: relevance to human disease. *Toxicol Pathol* 1999; 27:134-42.
 43. Burkhardt H, Koller T, Engstrom A, Nandakumar KS, Turnay J, Kraetsch HG et al. Epitope-specific recognition of type II collagen by rheumatoid arthritis antibodies is shared with recognition by antibodies that are arthritogenic in collagen-induced arthritis in the mouse. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2339-48.
 44. Straub RH, Cutolo M. Involvement of the hypothalamic--pituitary--adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role. *Arthritis Rheum* 2001; 44:493-507.
 45. Kuis W, de Jong-de Vos van Steenwijk, Sinnema G, Kavelaars A, Prakken B, Helders PJ et al. The autonomic nervous system and the immune system in juvenile rheumatoid arthritis. *Brain Behav Immun* 1996; 10:387-98.
 46. Fassold A, Falk W, Anders S, Hirsch T, Mirsky VM, Straub RH. Soluble neuropilin-2, a nerve repellent receptor, is increased in rheumatoid arthritis synovium and aggravates sympathetic fiber repulsion and arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 60:2892-901.
 47. Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by

- increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J* 2000; 14:2097-107.
48. Weidler C, Holzer C, Harbuz M, Hofbauer R, Angele P, Schölmerich J et al. Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:13-20.
49. Straub RH, Wahle M, Baerwald CG. Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis unter Betrachtung von neuroendokrino-immunen Interaktionen. In: Straub RH, (Hrsg.). *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 2: Spezielle Pathophysiologie*. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht; 2007, 80-88.
50. Straub RH, Besedovsky HO, del Rey A. Allgemeine Konzepte der Psychoneuroendokrino-Immunologie. In: Straub RH, (Hrsg.). *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen*. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht; 2007, 11-34.
51. Straub RH, Günzler C, Miller LE, Cutolo M, Schölmerich J, Schill S. Anti-inflammatory cooperativity of corticosteroids and norepinephrine in rheumatoid arthritis synovial tissue in vivo and in vitro. *FASEB J* 2002; 16:993-1000.
52. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Auflage; Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2007.
53. Felten DL, Felten SY, Bellinger DL, Carlson SL, Ackerman KD, Madden KS et al. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol Rev* 1987; 100:225-60.
54. Abrass CK, O'Connor SW, Scarpace PJ, Abrass IB. Characterization of the beta-adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage. *J Immunol* 1985; 135:1338-41.

-
55. Felten SY, Felten DL, Bellinger DL, Carlson SL, Ackerman KD, Madden KS et al. Noradrenergic sympathetic innervation of lymphoid organs. *Prog Allergy* 1988; 43:14-36.
56. Hadden JW, Hadden EM, Middleton E Jr. Lymphocyte blast transformation. I. Demonstration of adrenergic receptors in human peripheral lymphocytes. *Cell Immunol* 1970; 1:583-95.
57. Pongratz G SV. Rezeptoren für Neurotransmitter und Hormone auf und in Immunzellen. In: Straub RH, (Hrsg.). *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen*. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht; 2007, 47-55.
58. Schauenstein K Liebmann P. Regulation von Immunfunktionen durch Katecholamine. In: Straub RH, (Hrsg.). *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen*. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht; 2007, 91-102. 2015.
59. Härle P, Möbius D, Carr DJ, Schölmerich J, Straub RH. An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52:1305 -13.
60. Ebbinghaus M, Gajda M, Boettger MK, Schaible HG, Brauer R. The anti-inflammatory effects of sympathectomy in murine antigen-induced arthritis are associated with a reduction of Th1 and Th17 responses. *Ann Rheum Dis* 2012; 71:253-61.
61. Straub RH, Bijlsma JW, Masi A, Cutolo M. Role of neuroendocrine and neuroimmune mechanisms in chronic inflammatory rheumatic diseases--the 10-year update. *Semin Arthritis Rheum* 2013; 43:392-404.

-
62. Jenei-Lanzl Z, Capellino S, Kees F, Fleck M, Lowin T, Straub RH. Anti-inflammatory effects of cell-based therapy with tyrosine hydroxylase-positive catecholaminergic cells in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis* 2015; 74:444-51.
63. Frauwirth KA, Thompson CB. Regulation of T lymphocyte metabolism. *J Immunol* 2004; 172:4661-5.
64. Bachman ES, Dhillon H, Zhang CY, Cinti S, Bianco AC, Kobilka BK et al. betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science* 2002; 297:843-5.
65. Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J et al. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 2006; 312:734-7.
66. Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R, Lass A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res* 2009; 50:3-21.
67. Princiotta MF, Finzi D, Qian SB, Gibbs J, Schuchmann S, Buttgerit F et al. Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 2003; 18:343-54.
68. Blaxter K. Energy metabolism in animals and man. Cambridge New York New Rochelle Melbourne Sydney: Cambridge University Press, 1989.
69. Huang L, Garcia G, Lou Y, Zhou Q, Truong LD, DiMattia G et al. Anti-inflammatory and renal protective actions of stanniocalcin-1 in a model of anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2009; 174:1368-78.
70. Bian L, Josefsson E, Jonsson IM, Verdrengh M, Ohlsson C, Bokarewa M et al. Dichloroacetate alleviates development of collagen II-induced arthritis in female DBA/1 mice. *Arthritis Res Ther* 2009; 11:R132.

-
71. Nath N, Khan M, Rattan R, Mangalam A, Makkar RS, de MC et al. Loss of AMPK exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis disease severity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 386:16-20.
72. Straub RH. TRPV1, TRPA1, and TRPM8 channels in inflammation, energy redirection, and water retention: role in chronic inflammatory diseases with an evolutionary perspective. *J Mol Med* 2014; 92:925-37.
73. Stefanelli C, Bonavita F, Stanic' I, Farruggia G, Falcieri E, Robuffo I et al. ATP depletion inhibits glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis. *Biochem J* 1997; 322:909-17.
74. Benz R, McLaughlin S. The molecular mechanism of action of the proton ionophore FCCP (carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone). *Biophys J* 1983; 41:381-98.
75. Buttgereit F, Brand MD. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem J* 1995;312:163-7.
76. Bode U, Wonigeit K, Pabst R, Westermann J. The fate of activated T cells migrating through the body: rescue from apoptosis in the tissue of origin. *Eur J Immunol* 1997; 27:2087 -93.
77. Dziurla R, Gaber T, Fangradt M, Hahne M, Tripmacher R, Kolar P et al. Effects of hypoxia and/or lack of glucose on cellular energy metabolism and cytokine production in stimulated human CD4+ T lymphocytes. *Immunol Lett* 2010; 131 :97-105.
78. Nagl S, Baleizao C, Borisov SM, Schaferling M, Berberan-Santos MN, Wolfbeis OS. Optical sensing and imaging of trace oxygen with record response. *Angew Chem Int Ed Engl* 2007; 46:2317-9.
79. Ma Y, Wu S. Simultaneous measurement of brain tissue oxygen partial pressure, temperature, and global oxygen consumption during hibernation, arousal, and

- euthermy in non-sedated and non-anesthetized Arctic ground squirrels. *J Neurosci Methods* 2008; 174:237-44.
80. Diepart C, Jordan BF, Gallez B. A New EPR oximetry protocol to estimate the tissue oxygen consumption in vivo. *Radiat Res* 2009;172:220-5.
81. Naciri M, Kuystermans D, Al-Rubeai M. Monitoring pH and dissolved oxygen in mammalian cell culture using optical sensors. *Cytotechnology* 2008; 57:245-50.
82. Kensy F, John GT, Hofmann B, Buchs J. Characterisation of operation conditions and online monitoring of physiological culture parameters in shaken 24-well microtiter plates. *Bioprocess Biosyst Eng* 2005; 28:75-81.
83. Kocincova AS, Nagl S, Arain S, Krause C, Borisov SM, Arnold M et al. Multiplex bacterial growth monitoring in 24-well microplates using a dual optical sensor for dissolved oxygen and pH. *Biotechnol Bioeng* 2008; 100:430-8.
84. Gottfried E, Rogenhofer S, Waibel H, Kunz-Schughart LA, Reichle A, Wehrstein M et al. Pioglitazone modulates tumor cell metabolism and proliferation in multicellular tumor spheroids. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 67:117-26.
85. McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 2002; 416:52-8.
86. Gauchan P, Andoh T, Kato A, Kuraishi Y. Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Neurosci Lett* 2009; 458:93-5.
87. Knowlton WM, McKemy DD. TRPM8: from cold to cancer, peppermint to pain. *Curr Pharm Biotechnol* 2011; 12:68-77.
88. Ding Z, Gomez T, Werkheiser JL, Cowan A, Rawls SM. Icilin induces a hyperthermia in rats that is dependent on nitric oxide production and NMDA receptor activation. *Eur J Pharmacol* 2008; 578:201-8.

-
89. Proudfoot CJ, Garry EM, Cottrell DF, Rosie R, Anderson H, Robertson DC et al. Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Curr Biol* 2006; 16:1591-605.
90. Rossi HL, Vierck CJ, Jr., Caudle RM, Yezierski RP, Neubert JK. Dose-dependent effects of icilin on thermal preference in the hindpaw and face of rats. *J Pain* 2009; 10:646-53.
91. Werkheiser JL, Rawls SM, Cowan A. Mu and kappa opioid receptor agonists antagonize icilin-induced wet-dog shaking in rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 547:101-5.
92. Groenink L, Vinkers C, van OR, Olivier B. Models of anxiety: stress-induced hyperthermia (SIH) in singly housed mice. *Curr Protoc Pharmacol* 2009; Chapter 5: Unit 5.
93. Kort WJ, Hekking-Weijma JM, TenKate MT, Sorm V, VanStrik R. A microchip implant system as a method to determine body temperature of terminally ill rats and mice. *Lab Anim* 1998; 32:260-9.
94. von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:867-78.
95. von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 2000; 343:1020-34.
96. Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 1999; 286:2098-102.
97. Kim CH, Broxmeyer HE. SLC/exodus2/6Ckine/TCA4 induces chemotaxis of hematopoietic progenitor cells: differential activity of ligands of CCR7, CXCR3, or CXCR4 in chemotaxis vs. suppression of progenitor proliferation. *J Leukoc Biol* 1999; 66:455-61.

-
98. Johnston B, Butcher EC. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin Immunol* 2002; 14:83-92.
 99. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* 1993; 91:379-87.
 100. Baumhater S, Singer MS, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rosen SD et al. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* 1993; 262:436-8.
 101. Comerford I, Harata-Lee Y, Bunting MD, Gregor C, Kara EE, Mccoll SR. A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013; 24:269-83.
 102. Hogg N, Laschinger M, Giles K, McDowall A. T-cell integrins: more than just sticking points. *J Cell Sci* 2003; 116:4695-705.
 103. Shamri R, Grabovsky V, Gauguet JM, Feigelson S, Manevich E, Kolanus W et al. Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat Immunol* 2005; 6:497-506.
 104. Cyster JG, Schwab SR. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 2012; 30:69-94.
 105. Simmons S, Ishii M. Sphingosine-1-phosphate: a master regulator of lymphocyte egress and immunity. *Arch Immunol Ther Exp* 2014; 62:103-15.
 106. Kitano M, Hla T, Sekiguchi M, Kawahito Y, Yoshimura R, Miyazawa K et al. Sphingosine 1-phosphate/sphingosine 1-phosphate receptor 1 signaling in rheumatoid synovium: regulation of synovial proliferation and inflammatory gene expression. *Arthritis Rheum* 2006; 54:742-53.

-
107. Yatomi Y, Ruan F, Hakomori S, Igarashi Y. Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. *Blood* 1995; 86:193-202.
 108. Melendez AJ. Sphingosine kinase signalling in immune cells: potential as novel therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1784:66-75.
 109. Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:397-407.
 110. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 2004; 427:355-60.
 111. Lo CG, Xu Y, Proia RL, Cyster JG. Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. *J Exp Med* 2005; 201:291-301.
 112. Chiba K. FTY720, a new class of immunomodulator, inhibits lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus by agonistic activity at sphingosine 1-phosphate receptors. *Pharmacol Ther* 2005; 108:308-19.
 113. Chiba K, Adachi K. Discovery of fingolimod, the sphingosine 1-phosphate receptor modulator and its application for the therapy of multiple sclerosis. *Future Med Chem* 2012; 4:771-81.
 114. Sato DK, Nakashima I, Bar-Or A, Misu T, Suzuki C, Nishiyama S et al. Changes in Th17 and regulatory T cells after fingolimod initiation to treat multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2014; 268:95-8.
 115. Chiba K, Matsuyuki H, Maeda Y, Sugahara K. Role of sphingosine 1-phosphate receptor type 1 in lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus. *Cell Mol Immunol* 2006; 3:11-9.

-
116. Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J et al. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 2002; 296:346-9.
 117. Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R et al. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem* 2002; 277:21453-7.
 118. Graeler M, Shankar G, Goetzl EJ. Cutting edge: suppression of T cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate. *J Immunol* 2002; 169:4084-7.
 119. Pullen GR, Fitzgerald MG, Hosking CS. Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. *J Immunol Methods* 1986; 86:83-7.
 120. Romero-Steiner S, Musher DM, Cetron MS, Pais LB, Groover JE, Fiore AE et al. Reduction in functional antibody activity against *Streptococcus pneumoniae* in vaccinated elderly individuals highly correlates with decreased IgG antibody avidity. *Clin Infect Dis* 1999; 29:281-8.
 121. Romero-Steiner S, Holder PF, Gomez de LP, Spear W, Hennessy TW, Carlone GM. Avidity determinations for *Haemophilus influenzae* Type b anti-polyribosylribitol phosphate antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12:1029-35.
 122. Levine JD, Goetzl EJ, Basbaum AI. Contribution of the nervous system to the pathophysiology of rheumatoid arthritis and other polyarthritides. *Rheum Dis Clin North Am* 1987; 13:369-83.
 123. Straub RH, Lowin T, Klatt S, Wolff C, Rauch L. Increased density of sympathetic nerve fibers in metabolically activated fat tissue surrounding human synovium and mouse lymph nodes in arthritis. *Arthritis Rheum* 2011; 63:3234-42.

-
124. Pham TH, Okada T, Matloubian M, Lo CG, Cyster JG. S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress. *Immunity* 2008; 28:122-33.
 125. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunologie*. 5. Auflage; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2002.
 126. Soenawan E, Srivastava I, Gupta S, Kan E, Janani R, Kazzaz J et al. Maintenance of long-term immunological memory by low avidity IgM-secreting cells in bone marrow after mucosal immunizations with cholera toxin adjuvant. *Vaccine* 2004; 22:1553-63.
 127. Krebs HA. Body size and tissue respiration. *Biochim Biophys Acta* 1950; 4:249-69.
 128. Bellinger DL, Millar BA, Perez S, Carter J, Wood C, ThyagaRajan S et al. Sympathetic modulation of immunity: relevance to disease. *Cell Immunol* 2008; 252:27-56.
 129. Meyer C, Stumvoll M, Dostou J, Welle S, Haymond M, Gerich J. Renal substrate exchange and gluconeogenesis in normal postabsorptive humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282:428-434.
 130. Gerich JE. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabet Med* 2010; 27:136-42.
 131. Schedlowski M, Hosch W, Oberbeck R, Benschop RJ, Jacobs R, Raab HR et al. Catecholamines modulate human NK cell circulation and function via spleen-independent beta 2-adrenergic mechanisms. *J Immunol* 1996; 156:93-9.
 132. Moore TC. Modification of lymphocyte traffic by vasoactive neurotransmitter substances. *Immunology* 1984; 52:511-8.

-
133. Dhabhar FS, Malarkey WB, Neri E, McEwen BS. Stress-induced redistribution of immune cells--from barracks to boulevards to battlefields: a tale of three hormones--Curt Richter Award winner. *Psychoneuroendocrinology* 2012; 37:1345-68.
 134. Scheiermann C, Kunisaki Y, Lucas D, Chow A, Jang JE, Zhang D et al. Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. *Immunity* 2012; 37:290-301.
 135. Gallatin M, St John TP, Siegelman M, Reichert R, Butcher EC, Weissman IL. Lymphocyte homing receptors. *Cell* 1986; 44(5):673-80.
 136. Mackay CR. T-cell memory: the connection between function, phenotype and migration pathways. *Immunol Today* 1991; 12:189-92.
 137. Tsunemi S, Iwasaki T, Kitano S, Imado T, Miyazawa K, Sano H. Effects of the novel immunosuppressant FTY720 in a murine rheumatoid arthritis model. *Clin Immunol* 2010; 136:197-204.
 138. Ramachandran R, Hyun E, Zhao L, Lapointe TK, Chapman K, Hirota CL et al. TRPM8 activation attenuates inflammatory responses in mouse models of colitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110:7476-81.

8 Publikationen

Originalarbeiten

Klatt S, Stangl H, Kunath J, Lowin T, Pongratz G, Straub RH. Early sympathectomy inhibits egress of lymphocytes in control and arthritic animals and ameliorates experimental arthritis.

Brain Behav Immun. 2015, im Druck

Klatt S, Fassold A, Straub RH. Sympathetic nerve fiber repulsion: Testing norepinephrine, dopamine and 17 β - estradiol in a primary murine sympathetic neurite outgrowth assay. Ann NY Acad Sci. 2012; 1261:26-31.

Straub RH, Lowin T, **Klatt S**, Wolff C, Rauch L. Increased density of sympathetic nerve fibers in metabolically activated fat tissue surrounding human synovium and mouse lymph nodes in arthritis. Arthritis Rheum. 2011; 63:3234-42.

Vorträge

Klatt S. The spatial energy expenditure configuration and possible applications in an experimental model of arthritis. 10th Meeting of the German-Endocrine-Brain-Immune Network (GEBIN), Regensburg, 20.-23. März 2013

Klatt S. The spatial energy expenditure configuration and possible applications in an experimental model of arthritis. Tagung des Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI)- Arbeitskreises NeuroEndokrinoImmunologie (AKNEI), Dummerstorf, 2.-3. März 2012

Posterpräsentationen

Klatt S, Straub RH. Early sympathectomy inhibits egress of lymphocytes in control and arthritic animals and ameliorates arthritic disease. Annual Meeting of the American College of Rheumatology (ACR), Boston, USA, 14.-19. November 2014

Klatt S, Straub RH. The spatial energy expenditure and possible applications in an experimental model of arthritis. Annual Meeting of the American College of Rheumatology (ACR), San Diego, USA, 25.-30. Oktober 2013

Klatt S, Straub RH. The spatial energy expenditure and possible applications in an experimental model of arthritis. 20th Annual Meeting of the Psychoneuroimmunology Research Society (PNIRS), Stockholm, Schweden, 5.-8. Juni 2013

Klatt S, Straub RH. The spatial energy expenditure and possible applications in an experimental model of arthritis. 19th Annual Meeting of the Psychoneuroimmunology Research Society (PNIRS), San Diego, USA, 7.-9. Juni 2012

Klatt S, Straub RH. The spatial energy expenditure and possible applications in an experimental model of arthritis. Annual Meeting of the American College of Rheumatology (ACR), Chicago, USA, 4.-9. November 2011

9 Lebenslauf

Susanne Klatt

21.11.1984 Brandenburg a. d. H.
ledig

Beruflicher Werdegang

Seit 07/2010 bis dato

Promotion zur Erlangung des akademischen
Grades: „Dr. rer. nat.“ am Universitätsklinikum
Regensburg in der Abteilung Innere Medizin I
(Titel der Arbeit: Die räumliche Energieverbrauchs-
konfiguration (SEEC) und mögliche Anwendungen
im Tiermodell der Arthritis)

04/2010

Erteilung der Diplomurkunde „Dipl. Biochemikerin“
durch die Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald

08/2007-04/2008

Auslandssemester an der Staatlichen Universität Sankt
Petersburg, Russland (Fakultät für Biologie)

10/2004-04/2010

Studium der Biochemie an der Ernst-Moritz-Arndt-
Universität Greifswald; Abschluss des Studiums mit
dem Diplom (Note: 2,1)

Schulbildung

06/2004

Abitur am von Saldern Gymnasium, Brandenburg/H.

08/1997-06/2004

von Saldern Gymnasium, Brandenburg/H.

08/1991-07/1997

Friedrich Eberhardt von Rochow-Grundschule,
Brandenburg/H.

10 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rainer H. Straub für die Möglichkeit an diesem interessanten Projekt zu arbeiten. Die Arbeit war eine perfekte Kombination aus Eigenständigkeit und umfassender Betreuung. Vielen Dank an dieser Stelle auch für die Möglichkeit der Besuche von zahlreichen Kongressen, durch die ich viele interessante naturwissenschaftliche und persönliche Erfahrungen sammeln konnte.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Hayo Castrop für die nette Betreuung meiner Arbeit als RIGeL-Mentor, sowie an Prof. Dr. Frank Buttgereit und Prof. Dr. Jörg Heilmann für die Begutachtung meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Rudolf Zechner für die Bereitstellung der ATGL-KO Mäuse bedanken.

Vielen Dank Hubert, Julia, Madlen und Zsuzsa für so manche Hilfe bei den Tierversuchen.

Ein herzlicher Dank gilt meinen Arbeitskollegen, die alle auf ihre Art zu einem wunderbaren Arbeitsklima beigetragen haben. Die vielen fachlichen Diskussionen zum Projekt, die netten Gespräche in Kaffee- und Mittagspausen, aber auch die privaten gemeinsamen Unternehmungen und Urlaube bei den Kongressreisen haben die Arbeit zu weit mehr als einer Doktorarbeit gemacht.

Ich danke meiner Familie, für die nie endende Unterstützung. Ohne euch hätte ich es nie geschafft.

Ein Dankeschön an alle, die ich hier nicht namentlich genannt habe, die aber auf ihr Art und Weise zum Gelingen der Arbeit und zu der schönen Zeit in Regensburg beigetragen haben.

DANKE!

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitates gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 28.04. 2015

Susanne Klatt